



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Caracterização de enzimas em peçonhas
animais: identificação de fosfolipases do
escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades
enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri***

Marta Regina Magalhães

Brasília, 2017

MARTA REGINA MAGALHÃES

Caracterização de enzimas em peçonhas animais: identificação de fosfolipases do escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri*

Tese apresentada do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientação: Profa. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz

Brasília, 2017

Wilson, Vitor, André e Marina, obrigada pela paciência, compreensão, companheirismo e simplesmente porque vocês existem...

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu forças para chegar até aqui e conseguir galgar mais este degrau na minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz por sua paciência e orientação no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Domingos Garrone Neto e Nelson Gomes de Oliveira Júnior pela coleta dos ferrões das araias para análise.

À Claudia Jimena Arena pela ajuda na cromatografia da peçonha de *Hadrurus*.

Ao Dr. Lourival Domingos Possani, do Instituto de Biotecnologia (IBT) da Universidade Nacional Autônoma do México pelo fornecimento da peçonha de *Hadrurus*.

À Coordenação do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas pelo suporte durante a realização dos experimentos.

Ao CNPq e ao CONACyT pelo apoio concedido por meio do Edital de Colaboração Bilateral entre o Laboratório de Toxinologia (UnB) e o IBT (UNAM).

À CAPES pelo apoio concedido por meio do Edital Toxinologia 063/2010.

À Lilibete Pereira de Oliveira, Sayonara Ay Moré e Bruno Barros Bittar, companheiros do laboratório de Toxinologia do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas pelo apoio, carinho e consideração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (UnB).

Ao meu marido e companheiro Wilson, pelo apoio incondicional durante a concretização deste projeto, em todos os momentos, felizes ou não.

Aos meus filhos, Vitor, André e Marina, que me deram colo durante o cansaço.

E a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Peçonhas animais são misturas complexas de componentes cuja função está relacionada com a defesa ou captura/digestão da presa e essa composição é variável de acordo com o grupo filogenético, distribuição geográfica, ontogenia, sexo, habitat, dieta. Dentre os componentes estão proteínas com atividade enzimática ou não, peptídeos vasoativos, amins biogênicas, aminoácidos livres, lipídeos, carboidratos, ânions e cátions. Este estudo isolou duas fosfolipases presentes na peçonha do escorpião *Hadrurus gerstchi* e analisou a composição enzimática da peçonha da arraia *Potamotrygon falkneri* com o objetivo de contribuir para o conhecimento da composição enzimática dessas peçonhas. Na peçonha de *Hadrurus gerstchi* foram isoladas duas fosfolipases. A primeira delas como massa molecular de 14 kDa, atividade específica de 13.529 U/mg, pH ótimo de atividade em 8,5, temperatura ótima de atividade entre 35-40°C, com estabilidade mantida até temperatura de 30°C. A segunda fosfolipase apresentou massa molecular de 11 kDa, atividade específica de 7.135 U/mg, pH ótimo de atividade 8,0 e estável até a temperatura de 10°C. As duas enzimas são cálcio dependentes o que sugere pertencerem ao grupo das fosfolipase A₂ e mostraram importante atividade hemolítica e edematogênica. A peçonha de *P. falkneri* foi testada frente às atividades enzimáticas de fosfolipase, hialuronidase, 5' nucleotidase, fosfodiesterase, L-aminoácido oxidase e atividades proteolíticas de colagenase, elastase, substratos cromogênicos de azocaseína e azoalbumina e atividade fibrinogenolítica. A peçonha apresentou resultados positivos para a maioria dos ensaios, com exceção de fosfodiesterase, L-aminoácido oxidase e atividade fibrinogenolítica, sendo que hialuronidase foi a enzima com maior atividade, seguida das enzimas proteolíticas, indicando a participação destas enzimas na fisiopatologia do envenenamento. Desta forma pode se concluir, que apesar de componentes comuns entre as duas espécies, a função destes componentes é diferente, quando se considera a biologia do animal. As arraias possuem uma peçonha com composição aparentemente mais simples do que a dos escorpiões, no sentido de qualidade e quantidade dos componentes. As moléculas, apesar de complexas, uma vez que possuem alta massa molecular e de arranjos estruturais complexos, parecem estar voltadas apenas para a função de defesa, provocando uma sintomatologia muito específica, caracterizada por um processo inflamatório grave, porém local, enquanto que a peçonha escorpiônica, além da defesa, também é utilizada para a captura e paralisia da presa.

ABSTRACT

Animal venoms are complex mixtures of components whose function is related to the defense or capture/digestion of prey and this composition is variable according to the phylogenetic group, geographic distribution, ontogeny, sex, habitat, diet. Among the components are proteins with enzymatic activity or not, vasoactive peptides, biogenic amines, free amino acids, lipids, carbohydrates, anions and cations. This study isolated two phospholipases present in the venom of the scorpion *Hadrurus gerstchi* and analyzed the enzymatic composition of the venom from *Potamotrygon falkneri* streak with the objective of contributing to the knowledge of the enzymatic composition of these venoms. In the venom of *Hadrurus gerstchi* two phospholipases were isolated. The first one had a molecular mass of 14 kDa, a specific activity of 13,529 U/mg, optimum activity pH of 8.5, optimal activity temperature of 35-40°C, with a stability maintained at a temperature of 30°C. The second phospholipase had molecular mass of 11 kDa, specific activity of 7,135 U/mg, optimum pH of activity 8.0 and stable until the temperature of 10°C. The two enzymes are calcium dependent, suggesting that they belong to the group of phospholipase A₂ and showed important hemolytic and edematogenic activity. The *P. falkneri* venom was tested against the enzymatic activities of phospholipase, hyaluronidase, 5'nucleotidase, phosphodiesterase, L-amino acid oxidase and proteolytic activities of collagenase, elastase, chromogenic substrates of azocasein and azoalbumin, and fibrinogenolytic activity. The venom presented positive results for most of the tests, with the exception of phosphodiesterase, L-amino acid oxidase and fibrinogenolytic activity, and hyaluronidase was the enzyme with the highest activity, followed by proteolytic enzymes, indicating the participation of these enzymes in the physiopathology of the poisoning. In this way it can be concluded that despite the common components between the two species, the function of these components is different when considering the biology of the animal. Streaks have a venom with composition apparently simpler than that of scorpions, in the sense of quality and quantity of the components. The molecules, although complex, since they have high molecular mass and complex structural arrangements, seem to be oriented only to the defense function, provoking a very specific symptomatology, characterized by a severe but local inflammatory process, while the venom scorpion, besides the defense, is also used for the capture and paralysis of the prey.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
Atividades enzimáticas das peçonhas animais	13
1. Introdução	13
2. Proteases	14
3. Fosfolipases	16
4. Hialuronidasas	21
5. L-aminoácido oxidase	21
6. Fosfodiesterases e 5'nucleotidasas	22
Capítulo I. Isolamento de uma fosfolipase da peçonha do escorpião <i>Hadrurus gerstchi</i>	23
1. Introdução	24
1.1. Os escorpiões	24
1.2. A peçonha escorpiônica	27
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivo Específico	31
3. Material e Métodos	32
3.1. Obtenção das amostras de estudo	32
3.2. Animais de experimentação	32
3.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF	33
3.4. Determinação da concentração protéica	33
3.5. Atividade enzimática de fosfolipase	33
3.6. Atividade hemolítica	34
3.7. Atividade edematogênica	35
3.8. Efeito do pH, temperatura e estabilidade da atividade fosfolipásica	35
3.9. Efeitos de íons metais e outros compostos na atividade fosfolipásica	36
3.10. Análise estatística	37
4. Resultados e Discussão	38

Capítulo II. Análise enzimática da peçonha de <i>Potamotrygon falkneri</i>	54
1. Introdução.....	55
1.1. Arraias.....	55
1.2. Aparato de peçonha das arraias.....	57
1.3. Aspectos clínicos do envenenamento por arraias dulcícolas e epidemiologia dos acidentes.....	61
1.4. Características da peçonha das arraias dulcícolas.....	63
2. Objetivos.....	65
2.1. Objetivo Geral.....	65
2.2. Objetivos específicos.....	65
3. Material e Métodos.....	66
3.1. Extração da peçonha de <i>Potamotrygon falkneri</i>	66
3.2. Dosagem de Proteínas.....	66
3.3. Fracionamento por cromatografia líquida.....	67
3.4. Atividade enzimática de fosfolipase.....	67
3.5. Atividade hialuronidásica.....	68
3.6. Atividade de 5'nucleotidase.....	68
3.7. Atividade enzimática de fosfodiesterase.....	69
3.8. Atividade enzimática de L-aminoácido oxidase.....	69
3.9. Atividade enzimática de colagenase.....	69
3.10. Atividade proteolítica sobre caseína.....	70
3.11. Atividade proteolítica sobre elastina.....	70
3.12. Atividade proteolítica sobre azocaseína e azoalbumina.....	70
3.13. Atividade fibrinogenolítica.....	71
4. Resultados e Discussão.....	72
Considerações Gerais	79
Conclusões	83
Perspectivas	84
Referências Bibliográficas	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema mostrando os sítios de ação das fosfolipases. As setas indicam a posição de atividade de cada enzima.

Figura 2. Classificação das fosfolipases A₂

Figura 3. Morfologia externa escorpião (Fonte: Ministério da Saúde, 2009)

Figura 4. Perfil cromatográfico da peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi* em coluna semi-preparativa de fase reversa C18. Alíquotas de 1mg da peçonha foram dissolvidas em TFA 0,1% e aplicadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Vydac, EUA) previamente equilibrada com TFA 0,1%. As frações foram eluídas sob um gradiente linear de acetonitrila 0-60% acidificada com TFA 0,1%, em fluxo de 1mL/min e monitoramento a 216 nm.

Figura 5. Perfil cromatográfico da região R3. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac (218TP54, 250mm x 4,6mm) em gradiente linear de 25-45% de acetonitrila em 30 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm

Figura 6. Perfil cromatográfico da fração cromatográfica PLA2_3. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac (218TP54, 250mm x 4,6mm) em gradiente linear de 20-40% de acetonitrila em 30 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

Figura 7. Perfil cromatográfico da fração cromatográfica PLA2_4. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac (218TP54, 250mm x 4,6mm) em gradiente linear de 30-50% de acetonitrila em 30 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

Figura 8. Perfil cromatográfico da região R4. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac (218TP54, 250mm x 4,6mm) em gradiente linear de 35-55% de acetonitrila em 40 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

Figura 9. Espectro de massa molecular da fração cromatográfica PLA2_3 obtido por MALDI-TOF. A amostra foi ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e aplicada em placa de ação inoxidável juntamente com 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (20µg/µL) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v).

Figura 10. Espectro de massa molecular da fração cromatográfica PLA2_4 obtido por MALDI-TOF. A amostra foi ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e aplicada em placa de ação inoxidável juntamente com 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (20µg/µL) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v).

Figura 11. Atividade hemolítica das enzimas purificadas sobre eritrócitos humanos. Uma suspensão de hemácias 2% foi adicionada a concentrações variadas das enzimas PLA2_3 e PLA2_4 (0,01-0,10 µg). Após incubação durante 60 min a 37°C, a absorbância do sobrenadante foi avaliada a 545 nm. (-■- PLA2_3; -●- PLA2_4).

Figura 12. Atividade edematogênica da PLA2-3. A atividade edematogênica foi avaliada utilizando um plestismômetro. Os dados foram obtidos nos tempo 0, 15, 30, 45, 90, 2h, 4h e 24h após a injeção da enzima nas doses entre 0,01 e 0,10 µg. O grupo controle recebeu salina. Os valores representam a média ± E.P.M. ***P<0,001. ANOVA seguido pelo teste T de Student Newman Keul.

Figura 13. Atividade edematogênica da PLA2-4. A atividade edematogênica foi avaliada utilizando um plestismômetro. Os dados foram obtidos nos tempos 0, 15, 30, 45, 90, 2h, 4h e 24h após a injeção da enzima nas doses entre 0,01 e 0,10 µg. O grupo controle recebeu salina. Os valores representam a média ± E.P.M. ***P<0,001. ANOVA seguido pelo teste T de Student Newman Keul.

Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade enzimática. O ensaio foi realizado em vários pH (4,0-10,0) utilizando gema de ovo como substrato na presença de CaCl₂

Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática. O ensaio foi realizado em pH 8,5, utilizando gema de ovo como substrato na presença de CaCl₂.

Figura 16. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática. As enzimas foram pré-incubadas em várias temperaturas (0-70°C) durante 2 horas. Após a incubação, o ensaio foi realizado em pH 8,5, na temperatura de 37°C, utilizando gema de ovo como substrato na presença de CaCl₂.

Figura 17. Espécime de *Potamotrygon* sp. Foto: Enrico Richter (2010)

Figura 18. Tipos anatômicos dos ferrões de arraias. (A) Tipo Gimnurídeo. (B) Miliobatídeo. (C) Dasiatídeo. (D) Urolofídeo. Adaptado de Halstead e Bunker (1953).

Figura 19. Corte transversal mostrando a área produtora do ferrão (modificado de

Figura 20. Mecanismo da “ferroada” por arraias

Figura 21. Perfil cromatográfico da peçonha de *Potamotrygon falkneri* em coluna BIOSEP-2000 (300 x 7,8 mm).

Figura 22. Atividade fibrinogenolítica de *Potamotrygon falkneri*. (F) fibrinogênio sem adição de amostra. (Pf) fibrinogênio incubado com peçonha de *P. falkneri*. (Ba) fibrinogênio incubado com peçonha de *Bothrops alternatus*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Purificação da PLA2_3. A atividade fosfolipásica foi analisada de acordo com o descrito no item 6 e dosagem de proteínas foi determinado de acordo com o método de Lowry (Item 5).

Tabela 2. Purificação da PLA2_4. A atividade fosfolipásica foi analisada de acordo com o descrito no item 6 e dosagem de proteínas foi determinado de acordo com o método de Lowry (Item 5).

Tabela 3. Efeitos de íons na atividade enzimática. O ensaio foi realizado em pH 8,5, na temperatura de 37°C, utilizando gema de ovo como substrato na presença de cada composto a ser testado. Para testar o EDTA, o ensaio foi realizado na presença de 10mM CaCl₂.

Tabela 4. Atividades enzimáticas identificadas na peçonha de *P. falkneri*

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS PEÇONHAS ANIMAIS

1. Introdução

As peçonhas possuem uma composição bastante complexa e suas funções estão relacionadas principalmente à aquisição de alimento (captura e digestão) e na defesa individual e/ou coletiva. Cada grupo de animais possui suas próprias exigências particulares para a ação de sua peçonha e essas exigências sofrem influência de vários fatores, dentre eles filogenia, distribuição geográfica, idade, sexo, dieta, habitat, ocorrendo praticamente em todos os níveis: interfamiliar, intergêneros, inter e intraespécies e individualmente (Chippaux *et al.*, 1991).

Os sinais clínicos apresentados nos envenenamentos provocados por animais peçonhentos são proporcionados por uma grande quantidade de componentes biologicamente ativos dentre eles proteínas com atividade enzimática ou não, peptídeos vasoativos, aminas biogênicas, aminoácidos livres, lipídeos, carboidratos, ânions e cátions. O efeito letal é causado por toxinas cujo alvo são receptores específicos localizados nas membranas celulares. Podem ainda perturbar a atividade de enzimas críticas, receptores ou canais iônicos provocando uma desorganização geral nos sistemas nervoso central e periférico, sistemas cardiovascular, neuromuscular, na coagulação sanguínea e na homeostase (Calvete *et al.*, 2009).

As enzimas desempenham um importante papel na atividade da peçonha uma vez que estão envolvidas em vários efeitos fisiopatológicos do envenenamento. Dentre as mais enzimas mais comumente encontradas nas peçonhas estão as proteases, fosfolipases, L-aminoácido oxidase, 5' nucleotidase, hialuronidases e as esterases.

2. Proteases

As proteinases são mais comumente descritas nas peçonhas ofídicas, especialmente nas serpentes da subfamília Viperinae (Teixeira *et al.*, 2009), mas também já foram descritas em várias outras peçonhas como, por exemplo, de peixes, abelhas, aranhas, escorpiões (Carrijo *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2011). Além de proteinases, essas enzimas podem receber várias nomeações como, por exemplo, enzimas proteolíticas, proteases, endopeptidases, peptidases. Estão classificadas em dois grandes grupos as metaloproteinases e as serinoproteinases.

As metaloproteinases (MPs) (EC 3.4.24), muito bem conhecidas nas peçonhas ofídicas, compreendem a subfamília M12 de metaloproteinases, também denominadas reprotinas que pertencem à família de metaloproteinases dependentes de zinco, uma vez que possuem este metal ligado ao sítio de atividade. Essas enzimas contêm pontes dissulfeto que estabilizam sua estrutura e função. As MPs são classificadas em três classes principais, P-I, P-II e P-III, de acordo com a organização de seu domínio. As enzimas classificadas como P-I possuem massa molecular entre 20-30 kDa e são compostas por um único domínio catalítico de metaloproteinase. As pertencentes ao grupo P-II têm massa molecular entre 30-60 kDa e, além do domínio catalítico de metaloproteinase, também é constituída por um domínio de desintegrina. As MPs pertencentes ao grupo P-III, cuja massa molecular varia entre 60-100 kDa), além de possuírem os dois domínios anteriormente citados, metaloproteinase e desintegrina, também possuem um outro domínio rico em cisteína (Calvete, 2005; Fox e Serrano, 2005; Sajevic *et al.*, 2011).

Várias atividades biológicas são atribuídas às metaloproteinases incluindo hemorragia, edema, hipotensão, inflamação e necrose (Gutiérrez e Rucavado, 2000), os quais são provocados pelas várias enzimas pertencentes a este grupo dentre elas as enzimas ativadoras de protrombina, ativadoras do fator X, enzimas fibrinogenolíticas, inibidores da agregação plaquetária e hemorraginas (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Sajevic *et al.*, 2011).

As serinoproteinases pertencem à família S1 de proteinases semelhantes à tripsina. Estas enzimas clivam as cadeias polipeptídicas em seu lado C-terminal em resíduos carregados positivamente. Possuem uma dobra típica de tripsina constituída pela tríade His-Asp-Ser, 12 resíduos de cisteína, dos quais 10 são emparelhados em 5 pontes dissulfeto, da mesma forma que na tripsina. Os outros dois resíduos de cisteína restantes formam uma ponte que é característica das serinoproteinases. Na sua forma madura, geralmente são glicoproteínas de cadeia simples, com massa molecular variando entre 26 e 67 kDa. Agem sobre uma grande diversidade de substratos, demonstrando grande versatilidade em sua atividade, principalmente na agregação plaquetária, coagulação, fibrinólise, atuam sobre o sistema de complemento e no controle da pressão arterial. As enzimas mais comumente descritas e pertencentes a este grupo são as enzimas do tipo trombina, os ativadores dos fatores VII e V, ativador de proteína C, ativador do plasminogênio e ativadores da agregação plaquetária (Sajevic *et al.*, 2011).

Algumas serinoproteases são conhecidas por uma atividade do tipo calicreína, a qual é uma enzima que atua no sistema calicreína-cinina o qual é ativado em vários processos fisiológicos, tais como regulação de pressão sanguínea, funções renais e cardíacas, e também atua em processos patológicos como inflamações. Serinoproteases deste grupo, assim como a calicreína, liberam o hormônio hipotensor bradicinina através da clivagem do cininogênio (Monteiro *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2005; Serrano e Maroun, 2005).

3. Fosfolipases

As fosfolipases fazem parte de um grupo de enzimas, as hidrolases, que catalisam a clivagem de moléculas de fosfolipídios adicionando uma molécula de água, hidrolisando uma ou mais ligações ésteres dos glicerofosfolipídeos, sendo, dessa forma enquadradas em duas categorias, as acil hidrolases, as quais agem sobre ligações éster carboxílicas, e as fosfodiesterases, que hidrolisam ligações

fosfodiéster. No primeiro grupo estão as fosfolipases A₁ e A₂, fosfolipase B (lisofosfolipase), enquanto que o segundo grupo contém a fosfolipase C e fosfolipase D (Figura 1).

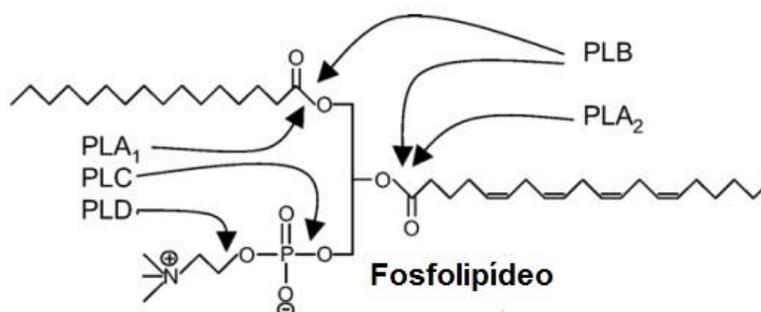


Figura 1. Esquema mostrando os sítios de ação das fosfolipases. As setas indicam a posição de atividade de cada enzima. Adaptado de Kohler *et al.* (2006).

Segundo a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Moss, 2015), as fosfolipases estão assim nomeadas:

EC 3. Hidrolases

EC 3.1. Atividade sobre ligações ésteres

EC 3.1.1. Ligações éster carboxílicas

EC. 3.1.1.32. **Fosfolipase A₁**

EC. 3.1.1.4. **Fosfolipase A₂**

EC. 3.1.1.5. **Fosfolipase B (Lisofosfolipase)**

EC. 3.1.4. Ligações fosfodiéster

EC. 3.1.4.3. **Fosfolipase C**

EC. 3.1.4.4. **Fosfolipase D**

Estas moléculas estão presentes em vários tipos celulares, incluindo bactérias, fungos, células vegetais e células animais, sendo que cada célula pode ter mais de um tipo de fosfolipase. São atribuídas três funções principais às fosfolipases, considerando sua relevância fisiológica. Elas podem servir como enzimas digestivas, como por exemplo, as fosfolipases presentes nas peçonhas, podem desempenhar papel importante na manutenção e remodelação da membrana, e ainda pode regular os mecanismos celulares, como por exemplo, a criação de moléculas de lipídeos bioativos (Waite, 1987).

As fosfolipases A₁ catalisam a clivagem de fosfolipídeos na posição sn-1, formando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Esta enzima está presente em inúmeras espécies de mamíferos, plantas, fungos, bactérias e protozoários, sendo que nestes últimos são considerados como fator de virulência (Belaunzaran *et al.*, 2013). PLA₁ possui uma vasta variedade de funções celulares que incluem regulação e facilitação da produção de mediadores de lisofosfolipídeos e ainda agem como enzimas digestivas. Os produtos da reação catalisada pelas PLA₁ são importantes em várias funções biológicas, como a agregação plaquetária e contração do músculo liso. Além disso, lisofosfolipídeos podem ser utilizados como tensoativos na indústria cosmética e alimentar devido à sua ação emulsificante (Richmond e Smith, 2011).

Na peçonha de vespas esta enzima tem sido muito bem caracterizada em várias espécies, sendo considerada como o principal alérgeno dessas peçonhas e ainda por atuar no processo inflamatório, causando o edema, assim como tem ação importante na ativação plaquetária (Sukprasert *et al.*, 2013).

Fosfolipase A₂ (PLA₂) hidrolisam fosfolipídeos na posição sn-2 do glicerol, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos. Elas hidrolisam vários tipos de fosfolipídeos, como por exemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, plasmogênio, plasmenilcolina, fator de agregação plaquetária. Estas enzimas tanto no ambiente intracelular como no extracelular são as mais bem estudadas, devido ao seu importante papel em várias atividades biológicas como, por exemplo, na fertilização, proliferação celular, contração muscular, hipersensibilização e nas doenças inflamatórias. Também têm grande importância nas funções celulares como transdução de sinal na via de biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, homeostase da membrana incluindo a manutenção do fosfolípido celular e reparo da membrana através de reações de desacilação e reacilação (Six e Dennis, 2000; Kini, 2003). As PLA₂s podem ser classificadas de acordo com vários parâmetros. Kini (1997) considerando a estrutura, sítio catalítico e massa molecular, classifica essas

enzimas em dois grandes grupos, as PLA₂ de alta massa molecular (140-400 kDa) e as de baixa massa molecular (13-15 kDa). O primeiro grupo ainda é subdividido em dois grandes grupos, que são as PLA₂ cálcio dependentes e as PLA₂ cálcio independente. O segundo grupo é subdividido em quatro grandes grupos – Grupo I, Grupo II, Grupo III e Grupo IV, como mostrado na Figura 2.

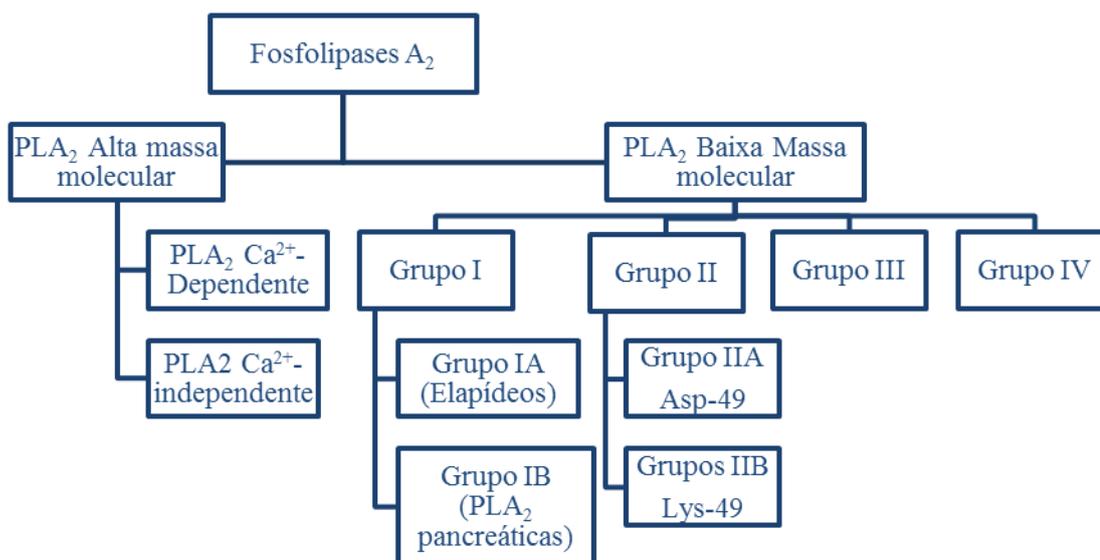


Figura 2. Classificação das fosfolipases A₂ (adaptado de Kini, 1997)

Estas enzimas são amplamente estudadas nos mais variados grupos de animais peçonhentos, onde têm um importante papel na digestão da presa, agindo em uma grande variedade de processos farmacológicas interferindo na homeostase, como por exemplo, têm atividade neurotóxica pré e pós sináptica, miotoxicidade, efeitos coagulantes, inibição da agregação plaquetária, atividade hipotensiva e convulsivante, indução de edema (Mukherjee, 2014; Bustillo *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2015; Damotharan *et al.*, 2016)

As fosfolipases B (PLB) é um grupo diferenciado de fosfolipases, uma vez que podem apresentar três atividades distintas: atividade de fosfolipase A₁, quando hidrolisam a ligação sn-1 do fosfolípídeo, ou de fosfolipase A₂, quando sua atividade ocorre na ligação sn-2; atividade de lisofosfolipase e ainda de transacilase. Esta enzima tem sido descrita e caracterizada em células de

mamíferos, bactérias e, especialmente em fungos onde geralmente são consideradas, apesar de várias controvérsias, como fator de virulência (Farn *et al.*, 2001; Kohler *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009).

Nas peçonhas, PLBs foram primeiramente descritas em serpentes e abelhas por Doery e Pearson (1964). Posteriormente também foram identificadas nas peçonhas de vespas (Abe *et al.*, 2000). Mais recentemente, utilizando-se de técnicas proteômicas e de transcriptoma, PLBs têm sido identificadas nas peçonhas de algumas serpentes da família Viperidae e Elapidae, dentre elas *Bungarus candidus* e *Bungarus fasciatus* (Rusmili *et al.*, 2014), *Crotalus adamanteus* (Margres *et al.*, 2014), *Micrurus fulvius* (Margres *et al.*, 2013), *Porthidium lansbergii lansbergii* (Jimenez-Charris *et al.*, 2015), *Bothrops erythromelas* (Jorge *et al.*, 2015), *Crotalus durissus terrificus* (Melani *et al.*, 2015), *Lachesis muta* (Wiesel *et al.*, 2015), *Gloydus intermedius* (Yang *et al.*, 2015), *Crotalus vegrandis* (Viala *et al.*, 2015). Apesar da grande quantidade de descrição da presença de PLB em peçonhas, ainda pouco se conhece seus efeitos e funções. Alguns autores descrevem que esta enzima é bastante estável, com atividade máxima em pH básico, em torno de 8-10, e importante atividade hemolítica e são ativadas por Ca^{2+} e Mg^{2+} .

As fosfolipases C (PLC) são responsáveis pela conversão de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Os dois produtos da reação catalisada pela PLC, DAG e IP3, são importantes no controle de diversos processos celulares e ainda são substratos para a síntese de outras moléculas importantes na sinalização. Quando PIP2 é clivado, DAG permanece ligado à membrana, e IP3 é liberado no citosol. IP3, em seguida, difunde-se através do citosol para se ligar a receptores específicos de IP3, os canais de cálcio do retículo endoplasmático liso, fazendo com que a concentração citosólica do cálcio aumente, causando uma cascata de alterações na atividade intracelular (Goni *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013)

Além disso, o cálcio e DAG, juntos, ativam a proteína C quinase (PCK). Além

disso, a fosfolipase C desempenha um papel importante na via de inflamação. A ligação de agonistas aos receptores na superfície de plaquetas pode desencadear a ativação da PLC, catalisando a liberação de ácido araquidônico e partir de fosfolipídeos de membrana, o qual pode então, seguir para a via da ciclooxigenase e a via da lipoxigenase. Mastoparanos presentes na peçonha de vespas pode ativar a fosfolipase C ou os produtos de sua reação na membrana plasmática de mamíferos (Wallace e Carter, 1989)

Fosfolipases D (PLD) catalisam a hidrólise da ligação fosfodiéster dos glicerofosfolipídeos ou esfingofosfolipídeos produzindo ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, ceramida-1-fosfato, colina livre e outras moléculas hidrofílicas, como serina, inositol e etanolamina. O ácido fosfatídico liberado no ambiente celular é metabolicamente convertido em diacilglicerol e/ou ácido lisofosfatídico, enquanto a ceramida-1-fosfato é convertida em esfingosina-1-fosfato. Ambas as moléculas podem agir como segundo mensageiros dentro das células, contribuindo para os efeitos de fosfolipase D (Chalfant e Spiegel, 2005).

Esta enzima foi detectada desde organismos simples como vírus e bactérias, até os mais complexos como plantas e vertebrados. Abordagens genéticas e farmacológicas colocam a PLD em uma grande variedade de processos celulares, dentre eles, sinalização de receptores, controle de transporte na membrana intracelular e reorganização do citoesqueleto de actina (Mcdermott *et al.*, 2004).

Fosfolipase D tem sido descrito como um fator dermonecrótico presente na peçonha de algumas espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (Catalan *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2013). Nestes estudos, a fosfolipase D provocou uma resposta inflamatória maciça na derme da pele de coelhos, provocando agregação de plaquetas, aumento da permeabilidade vascular, edema e morte e ainda pode ser responsável pelo quadro de nefrotoxicidade exibido no envenenamento causado por estas espécies.

4. Hialuronidases

Hialuronidases (EC: 3.2.1.35) catalisam a clivagem de ligações glicosídicas internas de alguns mucopolissacarídeos de tecidos animais, como por exemplo, ácido hialurônico e sulfato de condroitina A e C. São produzidas por bactérias e fungos, protozoários, tumores malignos, parasitos, crustáceos, lisossomas, esperma de mamíferos onde participam de diversos processos biológicos como fagocitose, mitose, desenvolvimento e implantação de embriões, adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Stern e Jedrzejak, 2006).

Nas peçonhas, a hialuronidase foi descrita em todos os grupos estudados sendo que sua atividade específica varia muito entre os diferentes grupos e até mesmo dentro dos mesmos gêneros. Não são tóxicas, mas são conhecidas por potencializar a toxicidade das peçonhas uma vez que atuam como um “fator de dispersão” contribuindo, dessa forma para o envenenamento, tanto local como sistêmico por facilitar a difusão das toxinas nos tecidos e na circulação das presas e/ou vítimas (Girish *et al.*, 2004; Wahby *et al.*, 2012b).

5. L-aminoácido oxidase

Outra enzima importante, muito comumente encontrada nas peçonhas, especialmente peçonhas ofídicas, é a L-aminoácido oxidase (LAAO, EC 1.4.3.2). Estas enzimas são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos em α -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Possuem massa molecular entre 110-150 kDa. Sua função específica na peçonha e, conseqüentemente no envenenamento, ainda é desconhecida, sendo que já foram reportados efeitos biológicos de ativação/inibição da agregação plaquetária, edema, hemorragia, hemólise, citotoxicidade, indução de apoptose, atividade antimicrobiana sobre bactérias, protozoários e vírus e ainda atividade antitumoral. Aparentemente os efeitos biológicos citados são decorrentes da ação

secundária do H_2O_2 , produzido durante a reação enzimática, o qual induz a apoptose celular (Costa *et al.*, 2015; Burin *et al.*, 2016).

6. Fosfodiesterase e 5'nucleotidase

Algumas enzimas são desconhecidas no ponto de vista de sua função nas peçonhas, apesar de serem descritas em várias espécies. Dentre estas estão as fosfodiesterases e as 5'nucleotidasas. As fosfodiesterases (E.C. 3.1.4.1) são moléculas de alta massa molecular que catalisam a hidrólise de ligações fosfodiéster. São consideradas como exonucleases uma vez que catalisam a hidrólise de DNA e RNA iniciando na extremidade 3' do polinucleotídeo liberando 5'mononucleotídeos, sendo, por essa razão, muito utilizadas nos estudos da estrutura e sequência de DNAs. São muito conhecidas nas peçonhas ofídicas, mas também já foram descritas em peçonhas de alguns peixes (Sivan *et al.*, 2010; Fox, 2013). Estas enzimas podem influenciar em uma grande variedade de processos farmacológicos incluindo produção e ação de mediadores inflamatórios, funções em canais iônicos, contração muscular, diferenciação celular, apoptose, lipogênese, glicogenólise e gliconeogênese (Jeon *et al.*, 2005).

A enzima 5'nucleotidase (EC: 3.1.3.5) é uma fosfomonoesterase característica do fígado, rim e sêmen. Hidrolisa o fosfato esterificado do carbono 5' de ribose e desoxirribose. É conhecida em peçonhas ofídicas, peixes, lagartos, artrópodos e himenópteros (Tan e Ponnudurai, 1992). Alguns autores sugerem que a 5'nucleotidase tenha uma ação sinérgica com outras enzimas como ADPase, fosfolipase e proteases para obter uma maior atividade anticoagulante (Silva Jr e Aird, 2001; Dhananjaya *et al.*, 2009). De acordo com Le Hir e Kaissling (1993) a 5'nucleotidase parecer produzir adenosina que age como um hormônio local, modificando uma variedade de processos fisiológicos.

Capitulo I

ISOLAMENTO DE UMA FOSFOLIPASE DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Hadrurus gerstchi*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os escorpiões

Os escorpiões pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida e à ordem Scorpiones que inclui aproximadamente 2.000 espécies distribuídas 16 famílias dentre elas Bothriuridae, Chactidae, Chaerilidae, Pseudochactidae, Euscorpiidae, Heteroscorpionidae, Iuridae, Caraboctonidae, Vaejovidae, Scorpionidae, Superstitioniidae, Troglotayosicidae, Hormuridae, Typhlochactidae, Buthidae e Hemiscorpiidae, em um total de 190 gêneros, sendo que os escorpiões de maior interesse médico estão incluídos dentro da família Buthidae e Hemiscorpiidae. Os escorpiões são de origem aquática no período siluriano, e, por terem sofrido poucas mudanças morfológicas nos últimos 450 milhões de anos, alguns autores os definem como fósseis vivos (Lourenço, 2015).

Estão adaptados aos mais variados tipos de habitat, desde os desertos às florestas tropicais e do nível do mar a altitudes de até 4.400 metros. A maioria das espécies tem preferência por climas tropicais e subtropicais. São animais essencialmente predadores, alimentando-se principalmente de insetos e de outros pequenos animais (Stockmann, 2015).

Hadrurus um gênero de escorpiões que pertence à família Caraboctonidae. São fossoriais e popularmente conhecidos como “mata caballo”. São encontrados em desertos arenosos no noroeste do México e sudoeste dos Estados Unidos. As espécies deste gênero são grandes podendo atingir até no máximo 15 cm, e possuem cor em tons amarelados. Embora não seja considerado como perigoso, as picadas por escorpiões deste gênero são bastante dolorosas e, ao contrário de outras grandes espécies de escorpiões que se defendem usando seus poderosos pedipalpos para beliscar o agressor, as espécies do gênero *Hadrurus* preferem a picada. As espécies deste gênero são bastante ativas durante a noite.

O corpo dos escorpiões é revestido por um exoesqueleto de quitina que

suporta e protege suas estruturas internas. Divide-se em duas partes, o cefalotórox (prossoma), que é dorsalmente coberto por uma carapaça e o abdômen (opistossoma), que é composto pelo mesossoma e metassoma. No prossoma estão inseridos um par de quelíceras e um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de pernas; no mesossoma, em sua face ventral, está localizado o opérculo genital e os apêndices sensoriais em forma de pentes que permitem a captação de estímulos mecânicos e químicos do meio, além de espiráculos que são aberturas externas dos pulmões; o metassoma é constituído por cinco segmentos e na sua extremidade encontra-se o télson, o qual contém um par de glândulas produtoras da peçonha que desembocam em dois orifícios situados de cada lado da ponta do ferrão (Figura 3).

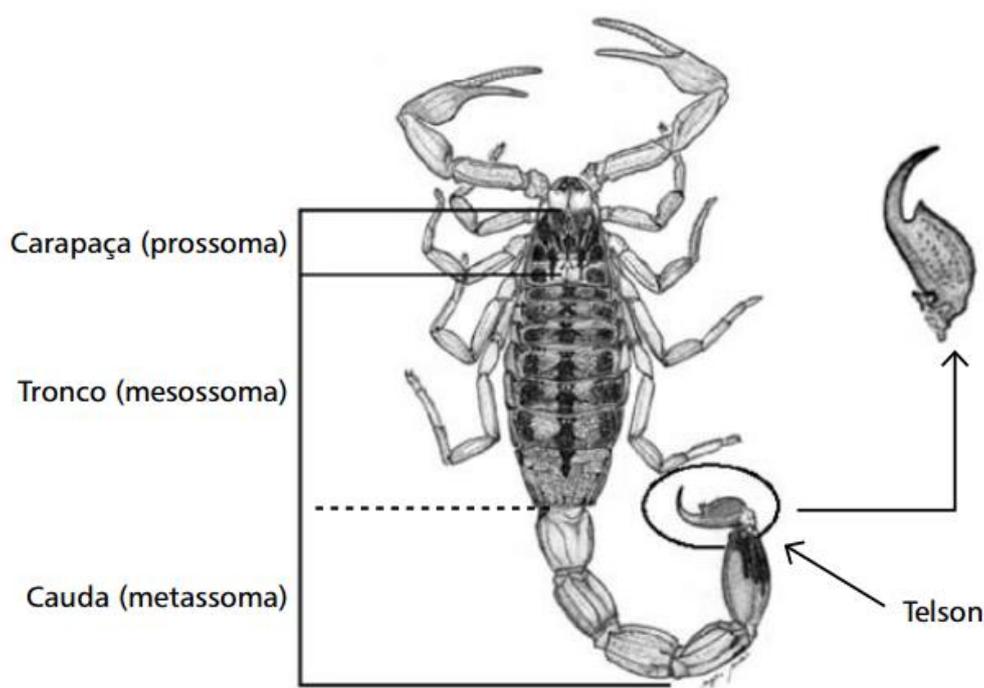


Figura 3. Morfologia externa escorpião (Fonte: Ministério da Saúde, 2009)

O aparato de peçonha dos está localizado na extremidade posterior do corpo do animal, ao final do metassoma, no télson. É constituído de um ferrão que é utilizado para a inoculação da peçonha, e por duas glândulas localizadas abaixo do exoesqueleto quitinoso. Escorpiões alimentam-se de insetos, aranhas e outros invertebrados pequenos, logo os componentes da peçonha atuam efetivamente na

paralisa dessas presas, mas também apresenta função de defesa, e é altamente letal para vertebrados, incluindo mamíferos (Stockmann, 2015).

O escorpionismo é o segundo acidente com animais peçonhentos de maior importância no mundo, representando um grave problema de saúde principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que ocorram aproximadamente 1,5 milhões de casos de envenenamento escorpiônico por ano, sendo que destes, cerca de 2.600 evoluem para morte. A incidência de escorpionismo é maior em indivíduos adultos, porém a ocorrência de quadros graves e a mortalidade são mais elevadas em crianças. Apesar da existência de várias espécies de escorpiões, a sintomatologia do envenenamento é similar para todas elas, variando basicamente na intensidade dos diferentes sinais que podem ser observados (Chippaux, 2012).

O quadro clínico pode ser classificado em leve, moderado e grave e a severidade do envenenamento está associada aos efeitos sistêmicos apresentados. O primeiro sinal clínico no envenenamento escorpiônico é a dor no local da picada, que ocorre imediatamente após a inoculação da peçonha e, em alguns casos pode-se detectar também edema, hiperemia, sudorese e piloereção. Dentro de poucas horas, as vítimas podem apresentar manifestações sistêmicas como agitação, taquicardia, sialorréia, sudorese, vômito, vasoconstrição periférica, hipo ou hipertensão, hiperglicemia, broncodilatação, dor abdominal entre outros. O quadro pode evoluir para choque cardiocirculatório e edema agudo do pulmão, sendo as causas mais frequentes de óbito (Cupo *et al.*, 1994; Chippaux, 2012).

Os sintomas locais observados nos envenenamentos escorpiônicos, como a dor, podem ser combatidos pela utilização de analgésicos e anti-inflamatórios. A soroterapia utilizando soro antiescorpiônico específico é o tratamento padrão para neutralizar os efeitos tóxicos, especialmente nos casos classificados como moderados e graves. O sucesso da imunoterapia depende da rapidez com que o soro é aplicado, assim como da via de administração e da potência do soro utilizado (Ismail, 2003; Chippaux, 2012).

1.2. A peçonha escorpiônica

A peçonha escorpiônica, da mesma forma que outras peçonhas, é uma mistura complexa de moléculas bioativas, composta por substâncias dentre as quais estão peptídeos e proteínas, principalmente enzimas, aminoácidos livres, aminas biogênicas, sais inorgânicos cuja função principal é defesa e captura da presa. Sua constituição está relacionada principalmente à predação e à digestão, tendo a defesa como papel secundário. É rico em neurotoxinas, proteínas de caráter básico de baixa massa molecular, que exercem seu efeito nocivo através de ligações de alta afinidade e especificidade com vários canais iônicos. Esta interação prejudica o funcionamento dos sistemas neuromuscular, respiratório e cardiovascular, fazendo com que as neurotoxinas sejam as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos observados em envenenamentos. Além disso, devido a sua alta afinidade e especificidade por seu alvo, essas moléculas são muito utilizadas para o estudo do funcionamento de canais iônicos, sendo importantes para o campo da fisiologia (Rodriguez De La Vega e Possani, 2005; Gopalakrishnakone *et al.*, 2015).

Os peptídeos presentes na peçonha de escorpiões podem ser classificados segundo vários critérios, como por exemplo, tamanho da cadeia proteica (cadeia longa ou curta), especificidade (toxinas específicas para mamíferos, insetos e crustáceos), mecanismo de ação (neurotoxinas ou citotoxinas) e ainda toxinas com ou sem pontes de dissulfeto (Zhijian *et al.*, 2006). Considerando o critério da ausência ou presença de pontes dissulfeto, os primeiros apresentam atividades biológicas do tipo antimicrobiana, hemolítica, atividade potencializadora de bradicinina (Zeng *et al.*, 2005). Já os que possuem pontes dissulfeto são os responsáveis pelos principais efeitos da peçonha escorpiônica por sua capacidade de interação com uma grande variedade de tipos e subtipos de canais iônicos, especificamente sobre os canais de sódio, potássio, cálcio e cloro (Rodriguez De La Vega e Possani, 2005; Quintero-Hernandez *et al.*, 2013; Santibanez-Lopez e Possani, 2015).

No ponto de vista médico, as toxinas que interagem com os canais de sódio em mamíferos, são as mais importantes. Estas toxinas são polipeptídeos que possuem entre 61-76 resíduos de aminoácidos, ligadas por quatro pontes dissulfeto, sendo classificadas em duas categorias, baseada nos seus efeitos fisiológicos sobre o canal: α -toxinas (aNaScTxS) que se ligam ao receptor 3 na superfície extracelular do canal e inibe a sua rápida inativação, e as β -toxinas (bNaScTxS), que se ligam ao receptor 4 e deslocam o limiar de ativação do canal para potenciais de membrana negativos. As toxinas que agem sobre canais para K^+ (KTxs), são peptídeos de cadeia curta, com 22 a 47 resíduos de aminoácidos e com 2 a 4 pontes dissulfeto. Os peptídeos que modulam a atividade dos canais para Ca^{2+} são menos comuns e podem ser divididos em dois tipos: os inibidores das correntes iônicas nos canais de Ca^{2+} Tipo T, que possuem em torno de 63 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto, e os peptídeos que especificamente modulam os canais de Ca^{2+} sensíveis a rianodina (Quintero-Hernandez *et al.*, 2013) e, por último os peptídeos moduladores do canal para cloreto, isolados de *Leiurus quinquestriatus*: a clorotoxina, que bloqueia a condutância dos canais para cloreto de células epiteliais (Debin *et al.*, 1993), GaTx1, que inibe os canais seletivos a ânions da proteína CFTR (Fuller *et al.*, 2007) e GaTx2 que inibe os canais CIC-2 (Thompson *et al.*, 2009)

Dentre as moléculas com atividade enzimática, as proteases, hialuronidases, e fosfolipases são comumente descritas na peçonha de escorpiões, seja identificando a atividade na peçonha bruta (Venancio *et al.*, 2013; Jridi *et al.*, 2015; Pucca *et al.*, 2015), ou utilizando-se de técnicas de transcritômicas e proteômicas (Schwartz *et al.*, 2007; Diego-Garcia *et al.*, 2014; Fuzita *et al.*, 2015; Luna-Ramirez *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

No banco de dados UniProtKb estão registradas, atualmente, a sequência de 21 fosfolipases identificadas a partir da peçonha de escorpiões cujas massas moleculares variam entre 10-40 kDa, sendo seis da espécie *Anuroctonus phaiodactylus*, quatro da espécie *Opisthacanthus cayaporum*, duas de *Pandinus*

imperator e uma de *Hadrurus gertschi*, *Heterometrus fulvipes*, *Heterometrus laoticus*, *Hottentotta judaicus*, *Mesobuthus gibbosus*, *Mesobuthus tamulus*, *Pandinus cavimanus*, *Taurulus bubalis* e *Tityus bahiensis* (Uniprotkb, 2015). Porém alguns outros autores isolaram e/ou identificaram também nas espécies *Opisthacanthus elatus*, *Hemiscorpius lepturus*, *Tityus discrepans*, qual foi identificada a atividade de uma enzima compatível com atividade de fosfolipase C (Louati *et al.*, 2013; Ramirez-Bello *et al.*, 2014; Jridi *et al.*, 2015; Estrada-Gomez *et al.*, 2016).

Poucos componentes têm sido identificados ou isolados a partir da peçonha de *H. gertschi*. A primeira molécula isolada e caracterizada foi a hadrurina, um peptídeo básico, com atividade antimicrobiana, cuja cadeia é composta por 41 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 4.436 Da. Este peptídeo foi citotóxico em eritrócitos humanos e inibiu o crescimento de *Salmonella thyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia colie*, *Serratia marscences*, provavelmente por um mecanismo de desestabilização da membrana dos microrganismos (Torres-Larios *et al.*, 2000). Importante salientar que, embora hadrurina tenha sido reportada como um componente da peçonha de *H. aztecus*, os espécimes utilizados naquele trabalho foram, posteriormente, identificados taxonomicamente como *H. gertschi* (Schwartz *et al.*, 2007).

O mesmo grupo de pesquisadores, em 2006, também identificou outra toxina, nomeada como HgeTx1, que age especificamente sobre canais de K⁺, com massa molecular de 3.950 Da. Esta toxina contém 36 resíduos de aminoácidos e sua cadeia é estabilizada por quatro pontes dissulfeto (Schwartz *et al.*, 2006).

Posteriormente Diego-Garcia e colaboradores (2007), identificaram a presença de escorpina e seus precursores na peçonha de *H. gertschi*, os quais foram obtidos por clonagem molecular. Ainda em 2007, Schwartz e colaboradores (2007), utilizando técnicas de transcrito, identificaram, com alta qualidade, 147 transcritos de moléculas de várias classes, dentre elas α -KTx, β -Ktx, escorpina,

peptídeos citotóxicos, peptídeos potenciadores de bradicinina, fosfolipases, inibidores de carboxipeptidase do tipo Kunitz, dentre outros. A fosfolipase identificada exibiu uma cadeia composta por duas subunidades sendo uma maior com 105 resíduos de aminoácidos e a menor com 25 resíduos de aminoácidos, estabilizadas por uma ponte dissulfeto, totalizando uma massa teórica em torno de 14 kDa (UniProtKb – P0C8L9 (PAE_HADGE)).

Os estudos que envolvem a peçonha da espécie de escorpião *Hadrurus gertschi* são ainda escassos, apesar de que as moléculas isoladas até o momento colaboram muito no conhecimento sobre o mecanismo de ação dessas peçonhas. A partir de um trabalho prévio, no qual este grupo de pesquisa conseguiu identificar a presença de fosfolipases na peçonha de *Hadrurus gertschi*, é importante investir na pesquisa, uma vez que, apesar das fosfolipases serem muito comuns e de atividade bastante conhecida em outras peçonhas, especialmente serpentes, nas peçonhas escorpiônicas ainda pouco se sabe sobre estas enzimas. A espécie em estudo, quando se considera o escorpionismo, não tem grande relevância, no ponto de vista médico, mas em tempos que a pesquisa na área de toxilogia se direciona para a identificação de moléculas que possam ser utilizadas como ferramentas e/ou novos fármacos, este trabalho também se justifica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Identificar, isolar e caracterizar duas fosfolipases presentes na peçonha de *Hadrurus gertschi*.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar e purificar por cromatografia líquida de alta eficiência duas fosfolipases presentes na peçonha de *Hadrurus gertschi*
- Identificar a massa molecular das fosfolipases isoladas através de espectrometria de massa tipo MALDI-TOF
- Caracterizar as atividades hemolítica e edematogênica das fosfolipases isoladas.
- Determinar pH e temperatura ótima de atividade enzimática e estabilidade da atividade enzimática das fosfolipases isoladas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras de estudo

A peçonha de *Hadrurus gerstchi* foi cedida pelo Dr. Lourival Domingos Possani, do Instituto de Biotecnologia (IBT), da Universidade Nacional Autônoma do México. As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de um fracionamento prévio realizado no Laboratório de Toxinologia, no qual 1 mg da peçonha total foi ressuspendido em água Milli-Q-TFA 0,1% e fracionadas em coluna de fase reversa C18, semi-preparativa (250 mm x 10 mm) (Vydac, EUA), previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição das frações foi realizada utilizando-se um gradiente linear de 0-60% de acetonitrila acidificada com 0,1% de TFA, durante 60 minutos em um fluxo de 1mL/min. A absorbância foi monitorada a 216 e 230 nm. As frações cromatográficas foram coletadas manualmente, dividindo-se por regiões cromatográficas, considerando-se o tempo de retenção de 10 minutos e, logo após secos a vácuo, e armazenados em temperatura de -80°C.

As frações coletas foram então recromatografadas, considerando-se o tempo de retenção e gradiente de acetonitrila de cada região cromatográfica.

3.2. Animais de Experimentação

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, e a manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Animais. Foram utilizados camundongos machos albinos Swiss com 18-22 gramas, fornecidos pelo Biotério do CEPB/PUC-GO (Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás), os quais foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com a dose a ser utilizada no experimento. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com água e ração *ad libitum*.

3.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF

A pureza e as massas moleculares das frações de interesse foram determinadas por espectrometria de massa. As frações foram ressuspensas em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em placa de ação inoxidável juntamente com 1 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (20µg/µL) ressuspensado em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v). A análise realizou-se em um equipamento Autoflexspeed MALDI TOF/TOF em modo linear. Os dados de espectrometria de massa obtidos foram analisados usando os *softwares* FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

3.4. Determinação da concentração protéica

A concentração proteica das amostras foi analisada como descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina bovina como padrão. Dez microlitros das amostras foram misturadas a 90µL de PBS, 1,0 mL da solução “C” composta de 90% de solução “A” (carbonato de sódio 2%, tartarato de sódio 0,05%, diluídos em hidróxido de sódio 0,1 N) e 10% de solução “B” (sulfato de cobre 0,1% diluído em água destilada). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se 100 µL de Reagente de Folin 1 N (Laborclin-610359), e, incubou-se a reação por 45 minutos em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, fez-se a leitura da absorvância em 750 nm em espectrofotômetro Ultrospec 200 (Pharmacia-Biotech). O cálculo da dosagem de proteína foi então plotado na curva padrão obtida com quantidades conhecidas de albumina bovina

3.5. Atividade enzimática de fosfolipase

As amostras coletadas do fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência foram testadas quanto a presença de atividade fosfolipásica. Para o *screening* inicial utilizou-se o método proposto por Marinetti (1965). Dez microlitros

de cada amostra foram adicionados a uma mistura de reação contendo 200 μL de gema de ovo, na concentração de 2 mg/mL diluída em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Um tubo branco foi preparado, porém substituindo-se o volume correspondente às amostras por tampão. Todos os tubos, teste e branco, foram incubados durante 30 min a 37°C e, logo após a absorvância foi analisada a 925 nm em espectrofotômetro Ultrospec 200 (Pharmacia-Biotech). A atividade enzimática específica corresponde à quantidade de enzima capaz de causar um decréscimo de 0,01 unidades de absorvância. Para identificar se a atividade enzimática de fosfolipase é dependente de cálcio, adicionou-se ao tampão de reação 25 mM de Ca^{2+} .

Com o objetivo de se verificar a ação hemolítica indireta da fosfolipase, utilizou-se também o método proposto por Gutierrez *et al.* (1984). Dez microlitros das amostras foram misturadas a uma mistura de reação contendo 15 μL de CaCl_2 10mM, 170 μL de eritrócitos humanos 2% diluídas em PBS e 7 μL de emulsão de gema de ovo a 2 mg/mL. Preparou-se um tubo branco contendo todos os reagentes substituindo-se as amostras das frações por tampão PBS. Após incubação por 30 min a 37°C, os tubos, branco e testes, foram centrifugados por 5 min a 2000 rpm e, logo após, a absorvância do sobrenadante analisada a 540 nm em espectrofotômetro Ultrospec 200 (Pharmacia-Biotech). A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de provocar um aumento de 0,001 unidades de absorvância por miligrama de proteína.

3.6. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica das PLA2s purificadas foi testada em eritrócitos humanos. O sangue foi coletado e imediatamente e imediatamente adicionado a citrato de sódio 3,2% para impedir a coagulação. Para obter a suspensão de hemácias, 2 mL do sangue foi misturado a 20 mL de PBS (pH 7,4) e centrifugado a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante desprezado. Este

processo foi repetido por 3 vezes. Para realizar o experimento, os eritrócitos foram ressuspendidos com o objetivo de se fazer uma solução a 2% de eritrócitos. Para a atividade hemolítica 10 µL de várias concentrações das enzimas purificadas (0,01-0,1µg/mL) foram adicionadas a 150 µL da suspensão de eritrócitos e incubadas durante 60 min a 37°C e então centrifugadas a 2.500 rpm por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 545 nm para medir o grau de hemólise. Um controle positivo (100% de hemólise) e um controle negativo (0% de hemólise) também foram incubados com os eritrócitos, utilizando Triton X-100 1% e PBS, respectivamente.

3.7. Atividade edematogênica

A atividade edematogênica foi avaliada segundo o método de Yamakawa *et al.* (1976). As patas posteriores direitas foram marcadas ao nível da borda pósteroproximal da proeminência do calcanhar e 20µL das enzimas purificadas em doses variando entre 0,01 e 0,10 µg foram aplicadas no coxim plantar da pata dos camundongos. Um volume igual de salina foi injetado no grupo controle. O edema foi mensurado utilizando-se um pletismômetro (Ugo-Basile) nos tempos 0h, 15min, 30min, 45min, 2h, 4h e 24 horas. O edema foi expresso como porcentagem de edema, utilizando a seguinte fórmula:

$$E(\%) = \frac{E_f - E_i}{E_i} \times 100$$

Onde: E = Edema E_f = Edema final E_i = Edema inicial

3.8. Efeito do pH, temperatura e estabilidade da atividade fosfolipásica

O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado realizando-se o ensaio enzimático para fosfolipase utilizando 10 µL das amostras das enzimas purificadas foram adicionadas à mistura de reação contendo 200 µL de gema de

ovo (2mg/mL), 15 μ L de CaCl_2 10mM diluída em tampão de acordo com a faixa de pH a ser analisada. Os tampões utilizados foram tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,0-6,0), Tris-HCl 100 mM (pH 7,0-10,0). Após incubação por 30 min a 37°C, a absorbância foi medida a 925 nm em espectrofotômetro Ultrospec 200 (Pharmacia-Biotech). A atividade enzimática específica corresponde à quantidade de enzima capaz de causar um decréscimo de 0,01 unidades de absorbância.

Para identificar a temperatura ótima de atividade fosfolipásica, o ensaio descrito acima foi realizado utilizando tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, nas temperaturas de 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40°, 45° e 50°C.

A estabilidade das enzimas foi testada realizando o protocolo da atividade enzimática após pré-incubação das mesmas durante 2 horas nas temperaturas entre 0°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60° e 70°C.

3.9. Efeito de íons metais e outros compostos na atividade fosfolipásica

O efeito dos íons Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} e ainda o composto EDTA, foram utilizados para analisar seus efeitos sobre a atividade fosfolipásica. O ensaio foi realizado adicionando-se 10 μ L das amostras das enzimas purificadas à mistura de reação contendo 200 μ L de gema de ovo (2mg/mL) diluído em tampão Tris-HCl pH 8,0 e 15 μ L de uma solução na concentração de 10mM de uma solução de FeSO_4 , HgCl_2 , MgSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , e MnSO_4 . Para testar a ação do EDTA utilizou-se a concentração de 25mM e 100mM e para o íon Ca^{2+} as concentrações utilizadas foram 10mM, 100mM e 200mM. Após incubação por 30 min a 37°C, a absorbância foi medida a 925 nm em espectrofotômetro Ultrospec 200 (Pharmacia-Biotech). A atividade enzimática específica corresponde à quantidade de enzima capaz de causar um decréscimo de 0,01 unidades de absorbância.

3.10. Análise Estatística

Os resultados foram plotados em tabelas no formato de média \pm DP e foram analisados utilizando-se ANOVA, teste T de Student-Newman Keul e pelo teste Tukey, com nível de significância de 0,05, através do software InStat[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento da peçonha bruta do escorpião *Hadrurus gertschi*, em coluna de fase reversa semipreparativa C18 (250 mm x 10 mm) (Vydac, EUA) resultou em aproximadamente 61 frações cromatográficas, sendo que a maior abundância destas foi eluída entre 25 e 42 minutos de tempos de retenção em um percentual de 25-42% de acetonitrila. O procedimento de coleta manual resultou em 5 regiões as quais foram denominadas como R1 (10-20 min), R2 (20-30 min), R3 (30-40 min), R4 (40-50 min), R5 (50-60 min) (Figura 4). Cada região foi submetida à análise de atividade enzimática, sendo que R3 e R4 apresentaram resultado de 603 U/mL e 54,8 U/mL, respectivamente.

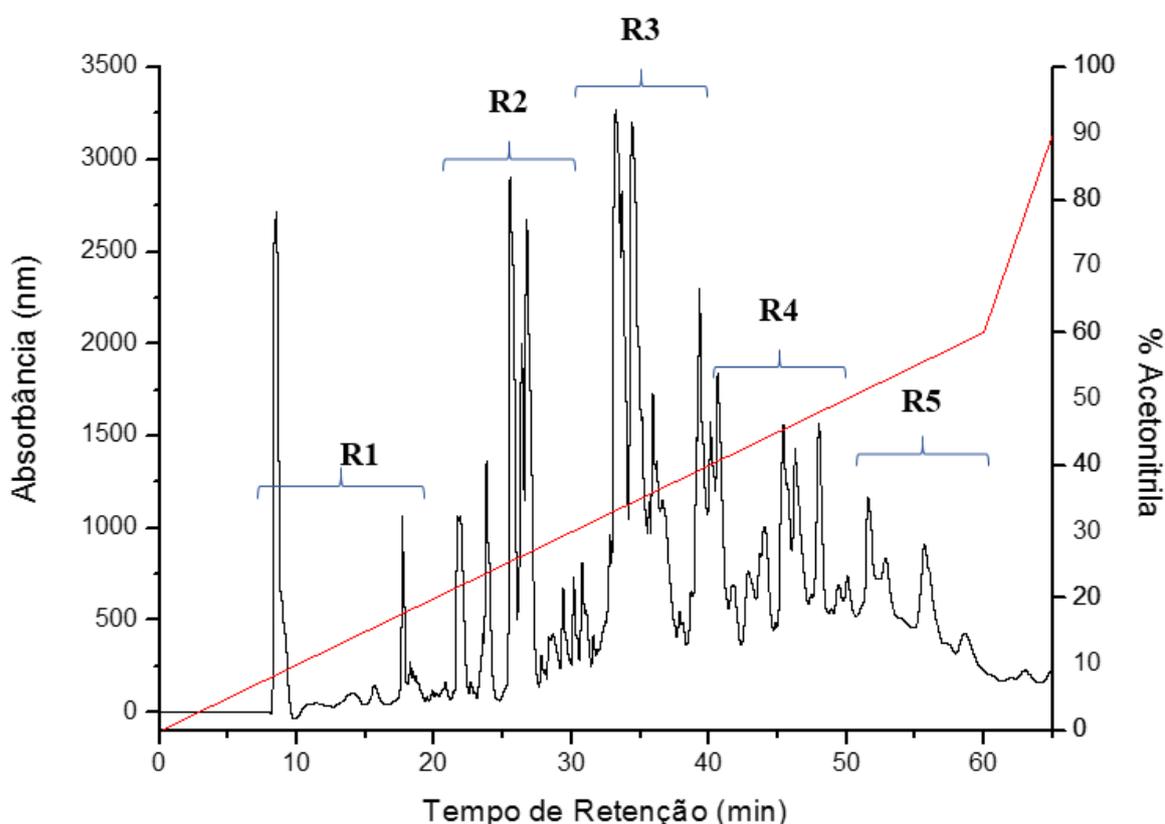


Figura 4. Perfil cromatográfico da peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi* em coluna semi-preparativa de fase reversa C18. Alíquotas de 1mg da peçonha foram dissolvidas em TFA 0,1% e aplicadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm x 10 mm) (Vydac, EUA) previamente equilibrada com TFA 0,1%. As frações foram eluídas sob um gradiente linear de acetonitrila 0-60% acidificada com TFA 0,1%, em fluxo de 1mL/min e monitoramento a 216 nm.

Essas regiões foram então recromatografadas considerando-se o gradiente de acetonitrila observado durante o primeiro fracionamento. Para a região R3 utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa C18 Vydac (218TP54, 250 mm x 4,6mm) em um gradiente linear de 25-45% de acetonitrila durante 40 min, em um fluxo de 1mL/min. Obteve-se 4 frações cromatográficas (Figura 5), as quais foram novamente submetidas à análise da atividade enzimática. Atividade fosfolipásica de 850 U/mL e 702 U/mL foi identificada nas frações cromatográficas 3 e 4, as quais foram denominadas PLA2_3 e PLA2_4, respectivamente.

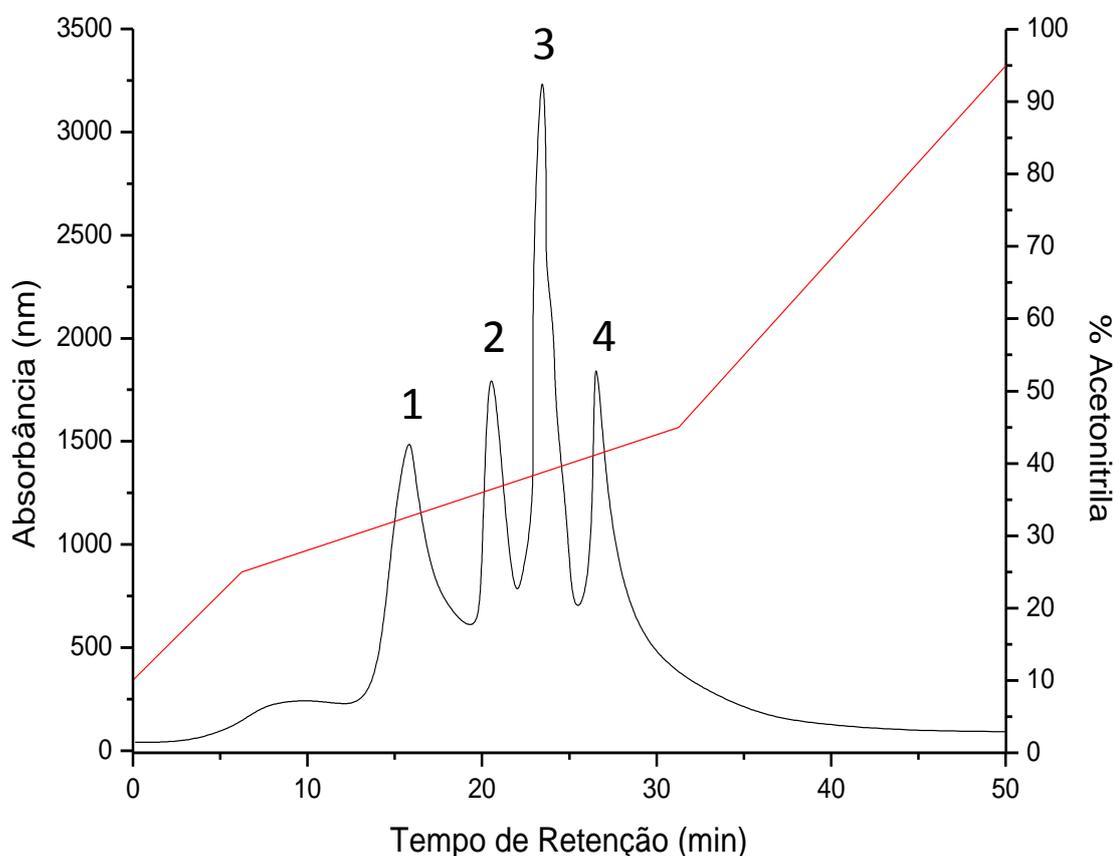


Figura 5. Perfil cromatográfico da região R3. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac (218TP54, 250mm x 4,6mm) em gradiente linear de 25-45% de acetonitrila em 30 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

A fração cromatográfica PLA2_3 foi recromatografada uma coluna analítica de fase reversa C18 Vydac (218TP54, 250 mm x 4,6 mm) em gradiente linear de 20-40% de acetonitrila durante 30 min. Obteve-se uma fração cromatográfica única que apresentou atividade fosfolipásica de 920 U/mL (Figura 6). Já a fração cromatográfica PLA2_4 foi submetida a uma nova cromatografia em uma coluna analítica de fase reversa C18 Vydac (218TP54, 250 mm x 4,6mm) em gradiente linear de 20-40% de acetonitrila durante 30 min. Uma fração cromatográfica única foi identificada e a atividade enzimática foi medida em 842 U/mL (Figura 7).

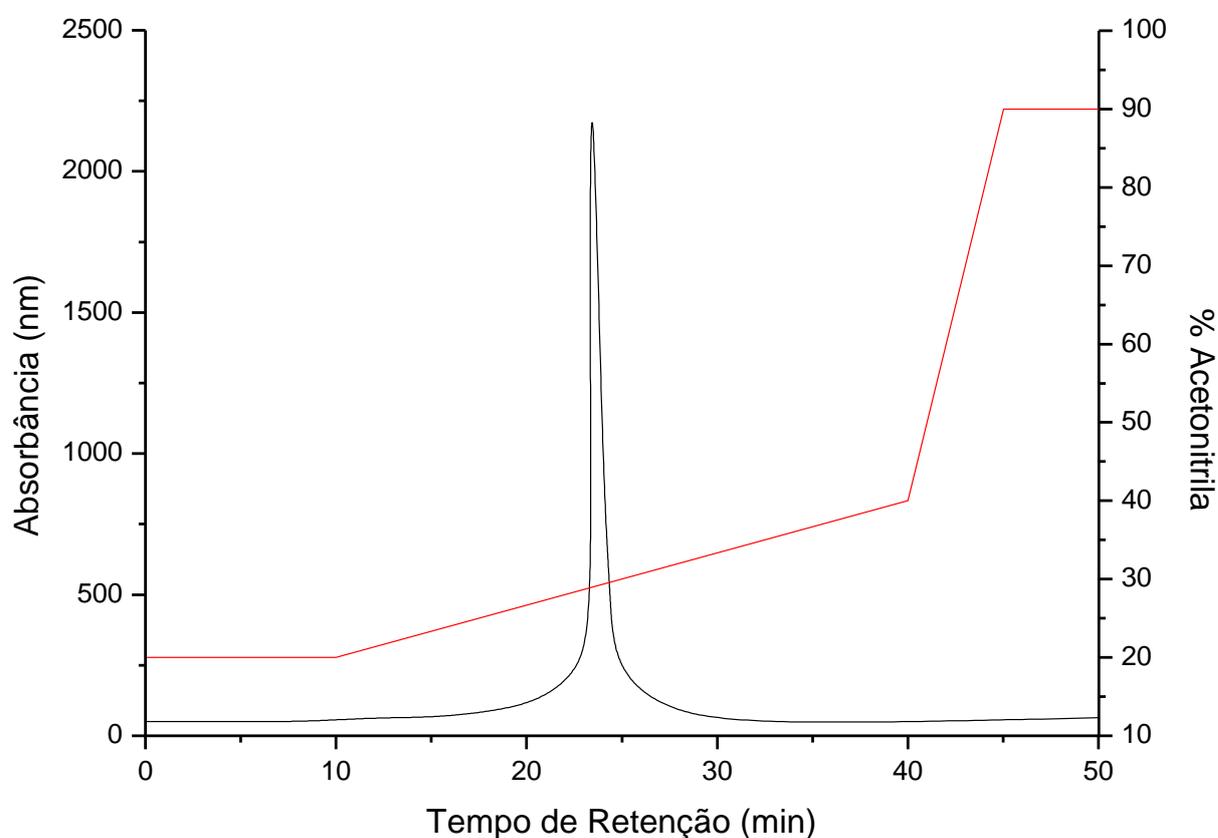


Figura 6. Perfil cromatográfico da fração cromatográfica PLA2_3. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac (218TP54, 250mm x 4,6mm) em gradiente linear de 20-40% de acetonitrila em 30 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

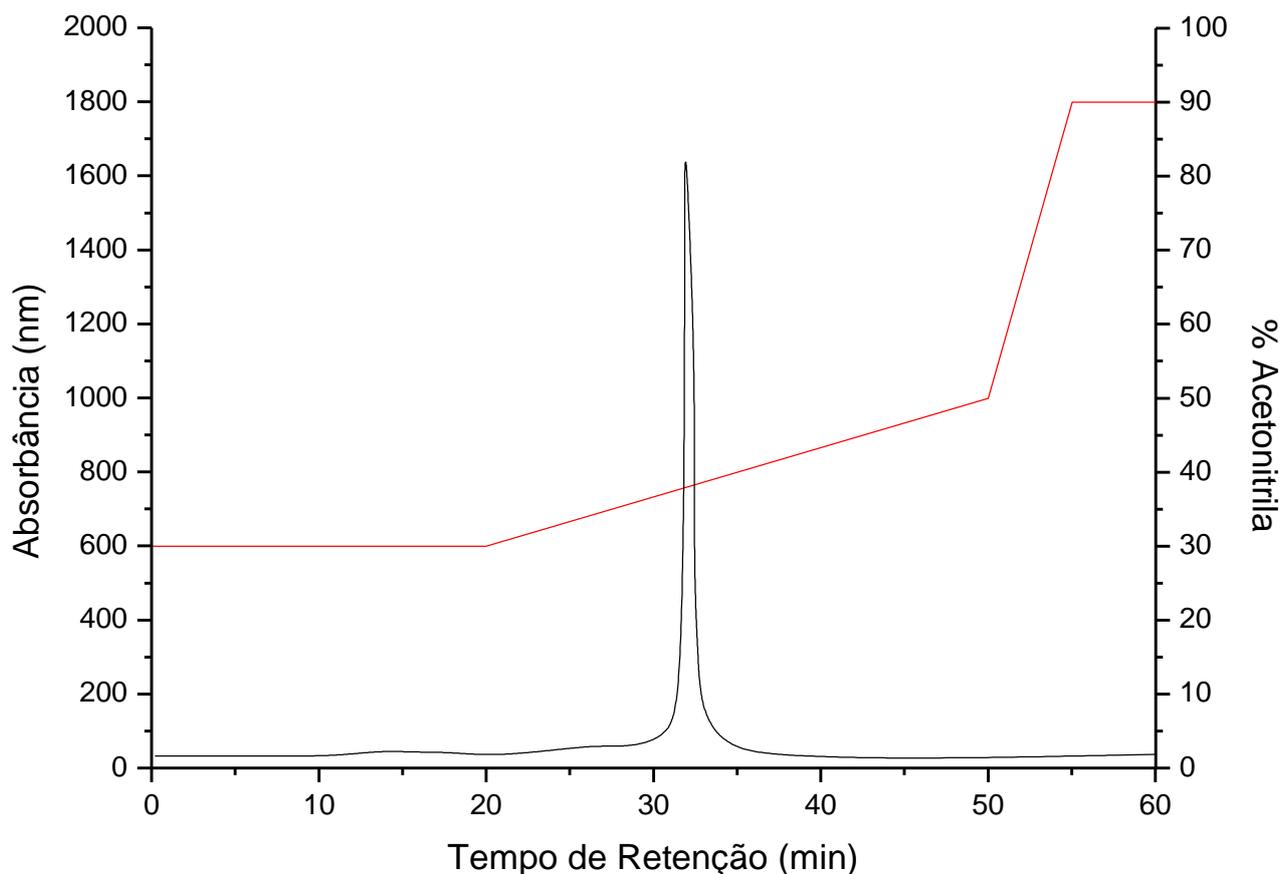


Figura 7. Perfil cromatográfico da fração cromatográfica PLA2_4. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac em gradiente linear de 30-50% de acetonitrila em 30 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

Com o protocolo de purificação descrito foi possível um rendimento de 21,9% e 38% das enzimas purificadas, respectivamente (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1. Purificação da PLA2_3. A atividade fosfolipásica foi analisada de acordo com o descrito no item 6 e dosagem de proteínas foi determinado de acordo com o método de Lowry (Item 5).

Passo Purificação	Proteína Total (µg/mL)	Atividade Total (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator Purificação	Rendimento (%)
1º Frac.	310	603	1.945	1	100
2º Frac.	185	850	4.594	2,36	59,6
3º Frac.	68	920	13.529	6,9	21,9

Tabela 2. Purificação da PLA2_4. A atividade fosfolipásica foi analisada de acordo com o descrito no item 6 e dosagem de proteínas foi determinado de acordo com o método de Lowry (Item 5).

Passo Purificação	Proteína Total (µg/mL)	Atividade Total (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator Purificação	Rendimento (%)
1º Frac.	310	603	1.945	1	100
2º Frac.	152	702	4.618	2,37	49
3º Frac.	118	842	7.135	3,67	38

Da mesma forma, a região R4 foi submetida a uma nova cromatografia, empregando-se uma coluna analítica de fase reversa C18 Vydac (218TP54, 250 mm x 4,6mm) em um gradiente linear de 35-55% de acetonitrila durante 40 min, em um fluxo de 1mL/min. O resultado obtido foi 5 frações cromatográficas bem caracterizadas e ainda uma fração com várias frações cromatográficas (Figura 8). Estas frações foram coletadas individualmente e testadas quanto à atividade fosfolipásica e o resultado encontrado foi negativo para todas as frações cromatográficas. O que pode indicar no primeiro teste realizado, após a primeira cromatografia, uma contaminação da amostra pelas frações cromatográficas da região anterior.

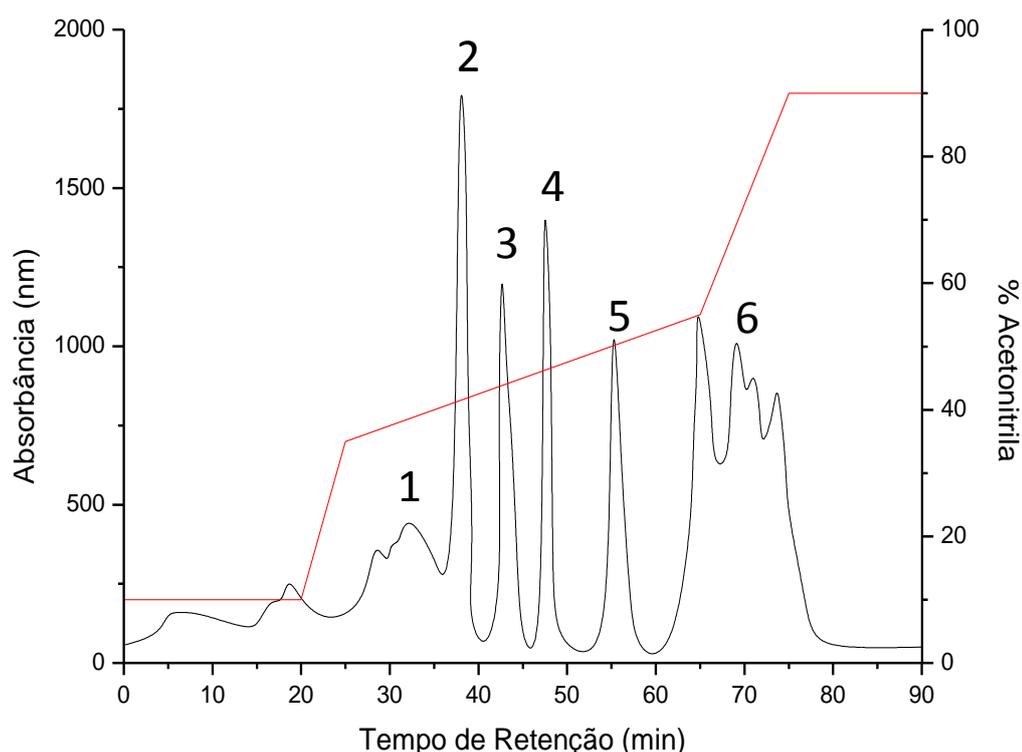


Figura 8. Perfil cromatográfico da região R4. A cromatografia foi realizada por HPLC em coluna analítica de fase reversa Vydac (218TP54, 250mm x 4,6mm) em gradiente linear de 35-55% de acetonitrila em 40 min, fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 216nm.

Para verificar o grau de pureza e as massas presentes nas frações cromatográficas 3 e 4, uma alíquota foi submetida à análise por espectrometria de

massas MALDI-TOF. Na fração cromatográfica PLA2_3 identificou-se uma massa 14.458 Da e sua dupla carga de 7.229 Da, enquanto que a fração cromatográfica PLA2_4 apresentou uma massa de 11.970 Da e a dupla carga de 5.985 Da (Figura 9 e Figura 10).

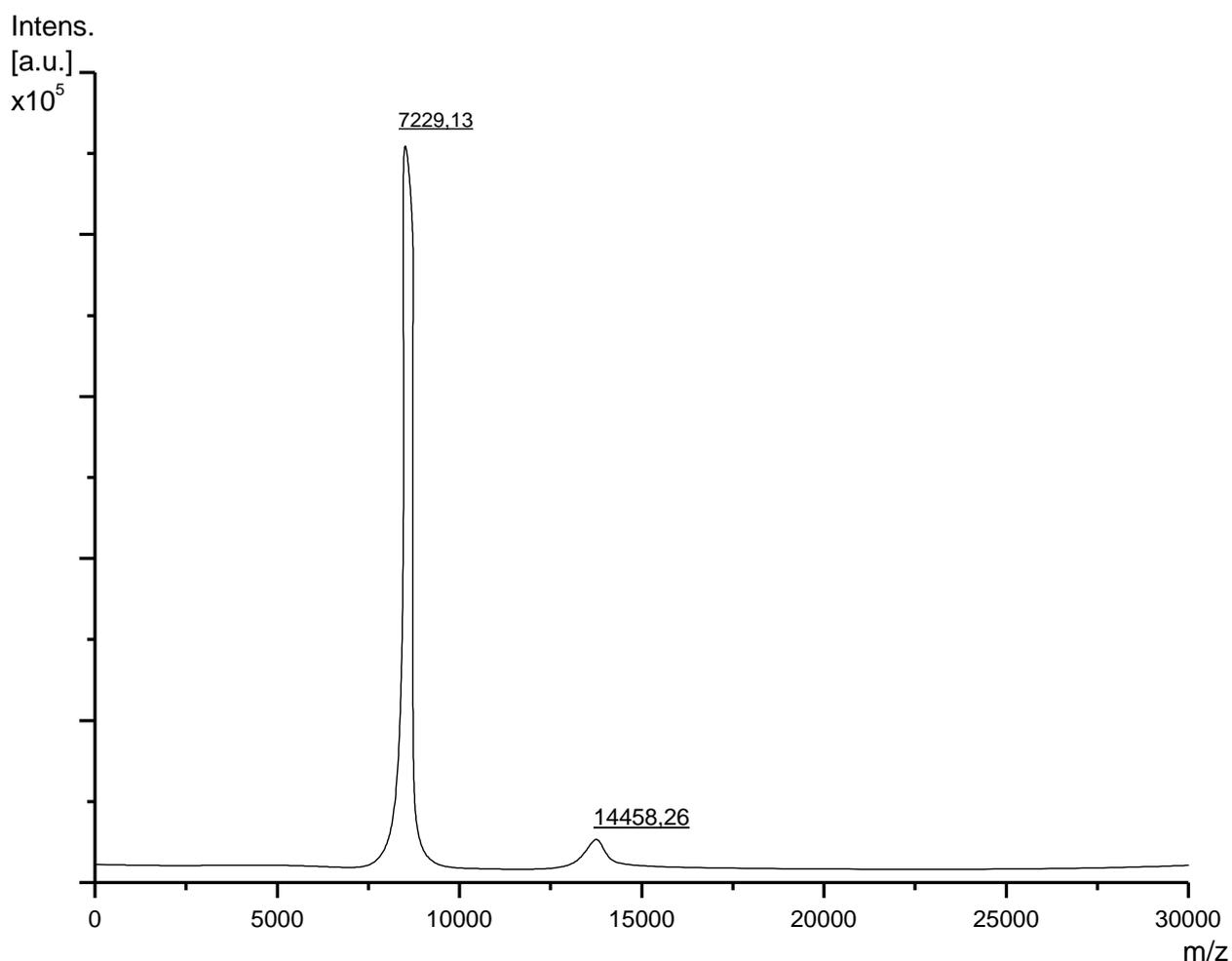


Figura 9. Espectro de massa molecular da fração cromatográfica PLA2_3 obtida por MALDI-TOF. A amostra foi ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e aplicada em placa de ação inoxidável juntamente com 1 μ L de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (20 μ g/ μ L) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v).

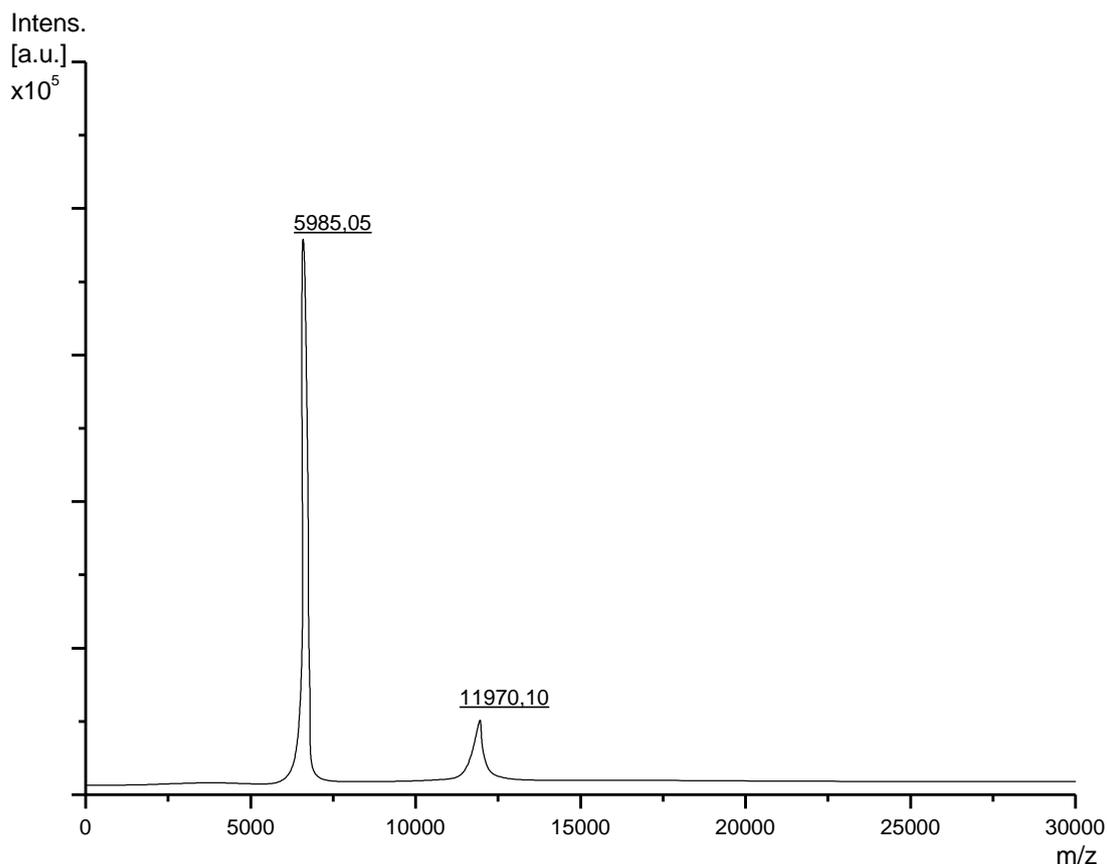


Figura 10. Espectro de massa molecular da fração cromatográfica PLA2_4 obtida por MALDI-TOF. A amostra foi ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1 μ L de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (20 μ g/ μ L) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v).

As duas enzimas purificadas demonstraram importante atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos, de forma dose dependente (Figura 11). A PLA2_3 provocou 100% na dose de 0,08 μ g, enquanto a PLA2_4 destruiu todas as células na dose de 0,10 μ g, demonstrando que a primeira parece possuir mais atividade hemolítica (Figura 12).

As enzimas PLA2_3 e PLA2_4 demonstraram importante atividade edematogênica, sendo que a segunda parece possuir um efeito ligeiramente maior. Os resultados demonstram que doses acima de 0,02 μ g causam edema importante, quando comparado com o controle, a partir de 15 minutos da injeção. O pico máximo de edema foi aos 45 min para as duas enzimas. Porém, na dose de 0,10 μ g, a enzima PLA2_4 demonstrou um pico máximo aos 90 min. Após 24

horas da injeção, as duas enzimas mantêm um edema significativo nas doses acima de 0,04 μ g (Figura 12 e Figura 13).

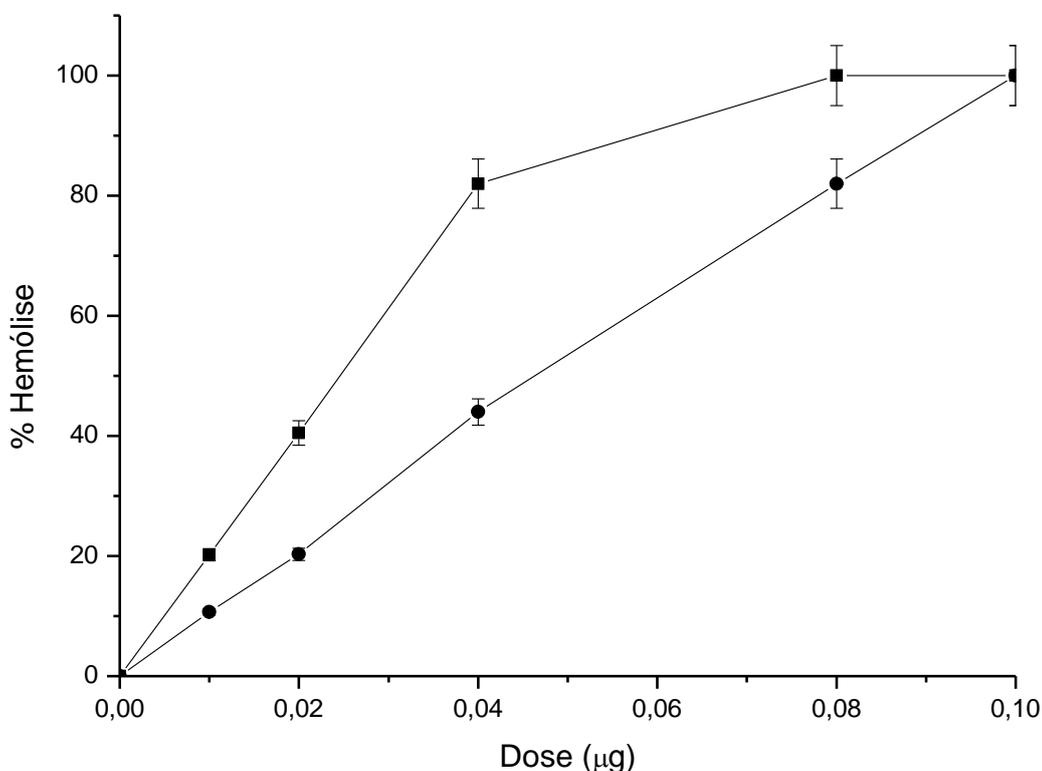


Figura 11. Atividade hemolítica das enzimas purificadas sobre eritrócitos humanos. Uma suspensão de hemácias 2% foi adicionada a concentrações variadas das enzimas PLA2_3 e PLA2_4 (0,01-0,10 μ g). Após incubação durante 60 min a 37°C, a absorbância do sobrenadante foi avaliada a 545 nm. (-■- PLA2_3; -●- PLA2_4).

A atividade enzimática das duas fosfolipases isoladas foram testadas em várias faixas de pH e temperatura, assim como também foi avaliada sua estabilidade. PLA2_3 obteve atividade máxima no pH 8,5, demonstrando uma leve estabilidade nos pH 8,0 e 9,0, já a enzima PLA2-4 mostrou melhor atividade em pH 8,0, porém com perda de atividade não significativa em pH 8,5 (Figura 14).

A temperatura ótima de atividade da PLA2_3 foi entre 35°C e 40°C, enquanto que PLA2_4 demonstrou melhor atividade na temperatura entre 40°C (Figura 15).

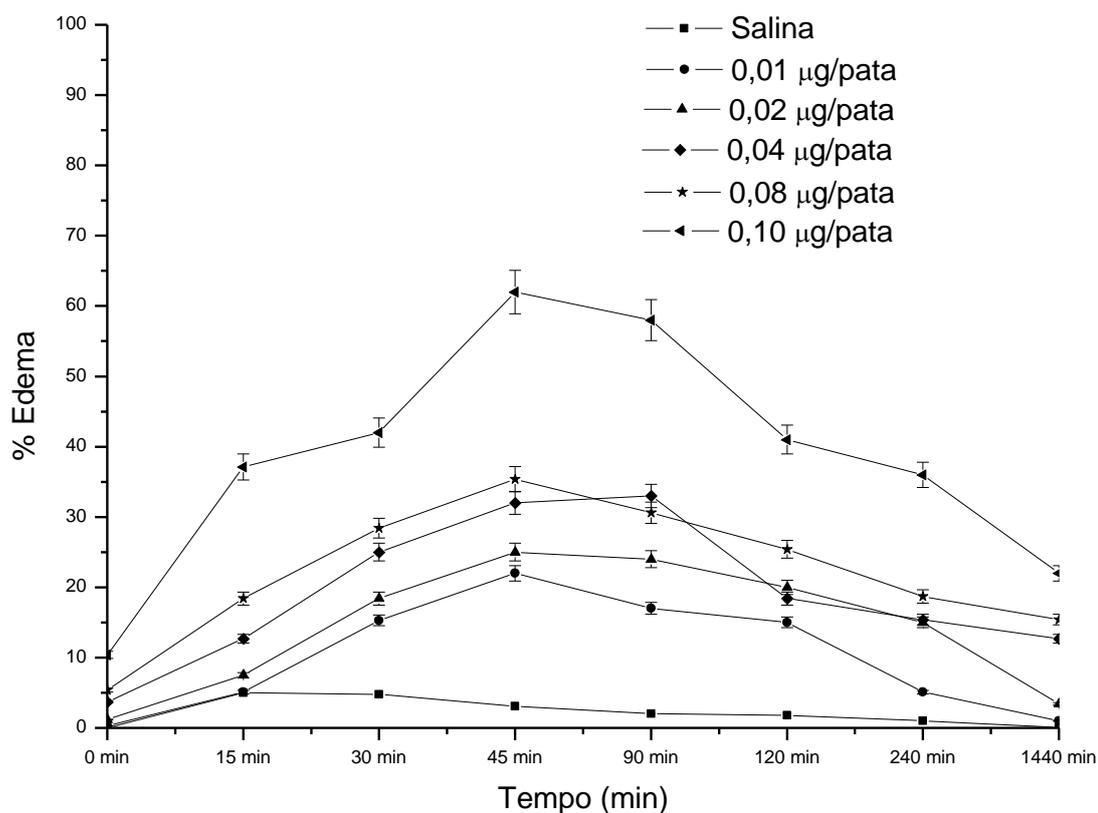


Figura 12. Atividade edematogênica da PLA2-3. A atividade edematogênica foi avaliada utilizando um plestismômetro. Os dados foram obtidos nos tempos 0, 15, 30, 45, 90, 2h, 4h e 24h após a injeção da enzima nas doses entre 0,01 e 0,10 µg. O grupo controle recebeu salina. Os valores representam a média \pm E.P.M. *** $P < 0,001$. ANOVA seguido pelo teste T de Student Newman Keul

Após uma pré-incubação das enzimas durante 2 horas em várias temperaturas entre 5-70°C, a atividade enzimática da PLA2_3 se manteve estável até a temperatura de 30°C, principalmente que ainda mantém 95% de sua atividade, e logo após decai drasticamente a partir de 50°C. A PLA2_4 se mantém estável até incubação de 10°C, onde mantém atividade de 95%, decaindo rapidamente a partir de 40°C (Figura 16).

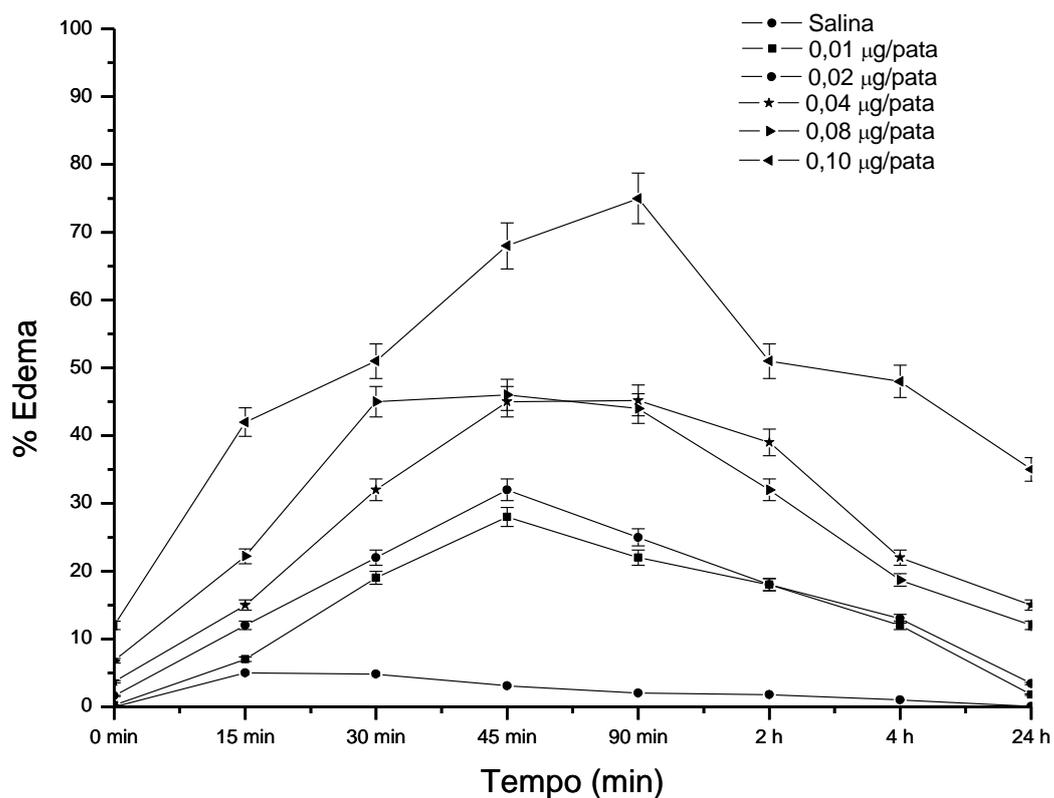


Figura 13. Atividade edematogênica da PLA2-4. A atividade edematogênica foi avaliada utilizando um plestismômetro. Os dados foram obtidos nos tempos 0, 15, 30, 45, 90, 2h, 4h e 24h após a injeção da enzima nas doses entre 0,01 e 0,10 µg. O grupo controle recebeu salina. Os valores representam a média \pm E.P.M. *** $P < 0,001$. ANOVA seguido pelo teste T de Student Newman Keul.

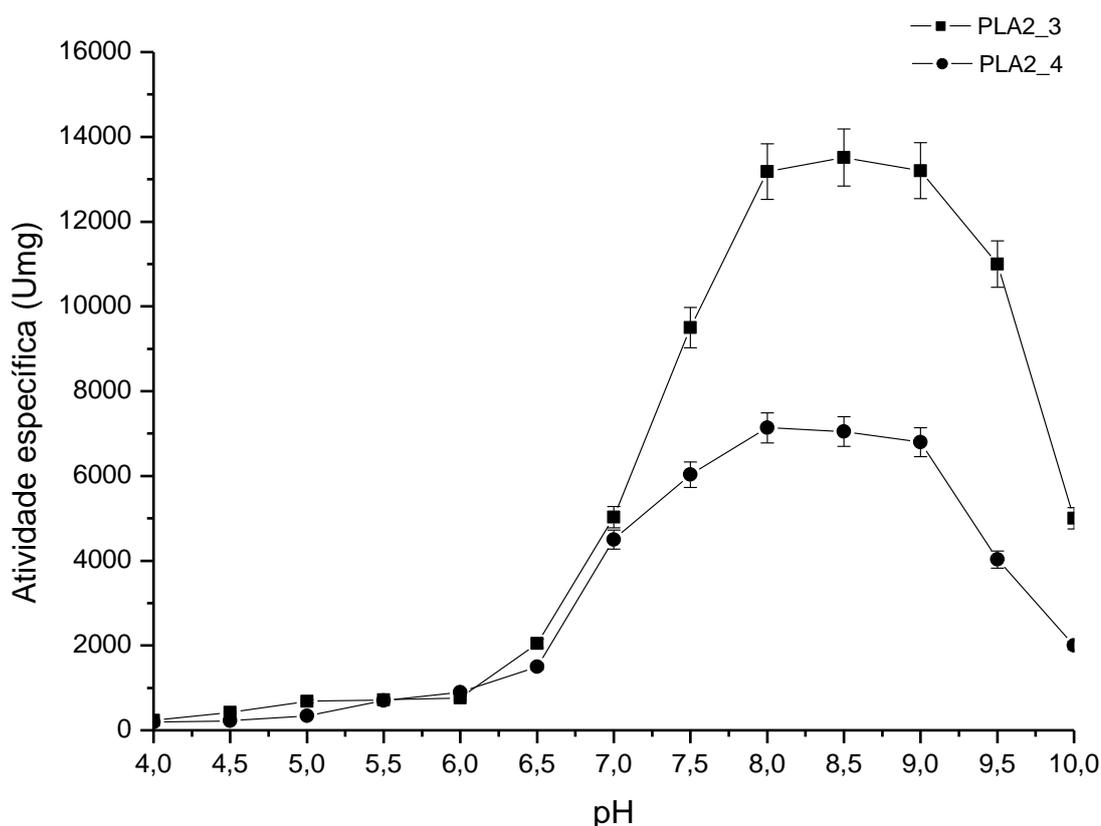


Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade enzimática. O ensaio foi realizado em vários pH (4,0-10,0) utilizando gema de ovo como substrato na presença de CaCl_2 .

A atividade enzimática das PLAs isoladas foi testada perante a ação de alguns íons (Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) e o composto EDTA. Os resultados mostram que os íons interferiram na atividade enzimática das duas moléculas de forma semelhante. O íon que inibiu mais fortemente a enzima foi 200mM Ca^{2+} , seguido de 100mM Ca^{2+} e Fe^{2+} . A atividade enzimática foi moderadamente inibida por Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e 100mM EDTA, e se manteve totalmente estável na presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} , 10mM Ca^{2+} e 25mM EDTA (Tabela 3).

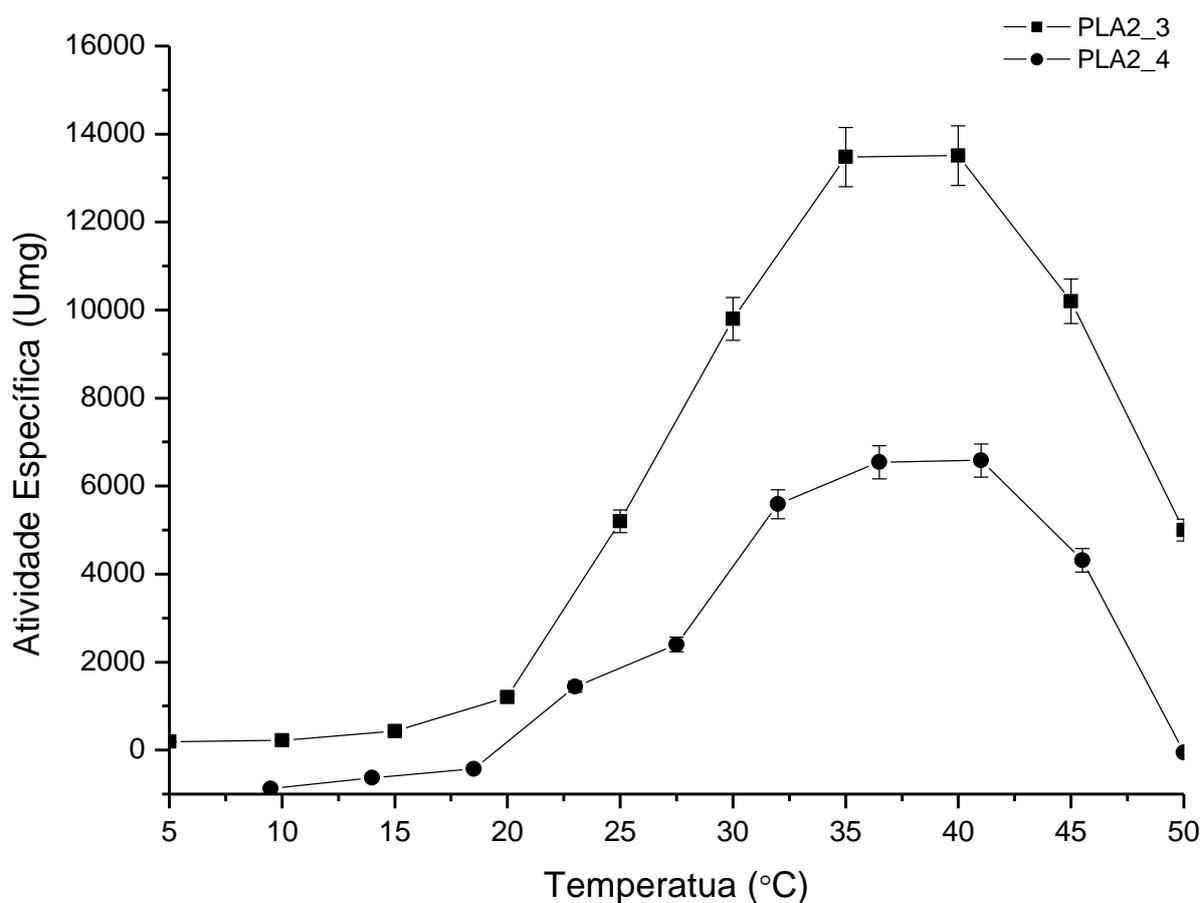


Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática. O ensaio foi realizado em pH 8,5, utilizando gema de ovo como substrato na presença de CaCl_2 .

Nas peçonhas animais, as enzimas são muito bem caracterizadas nas peçonhas ofídicas, nas quais as proteases, fosfolipases, hialuronidases dentre outras são muito bem conhecidas em sua estrutura e função. Nas peçonhas escorpiônicas vários estudos têm relatado a presença de enzimas tais como acetilcolinesterase, fosfatase alcalina, hialuronidase, fosfolipase A_2 , e proteases (Almeida *et al.*, 2002; Cologna *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2014).

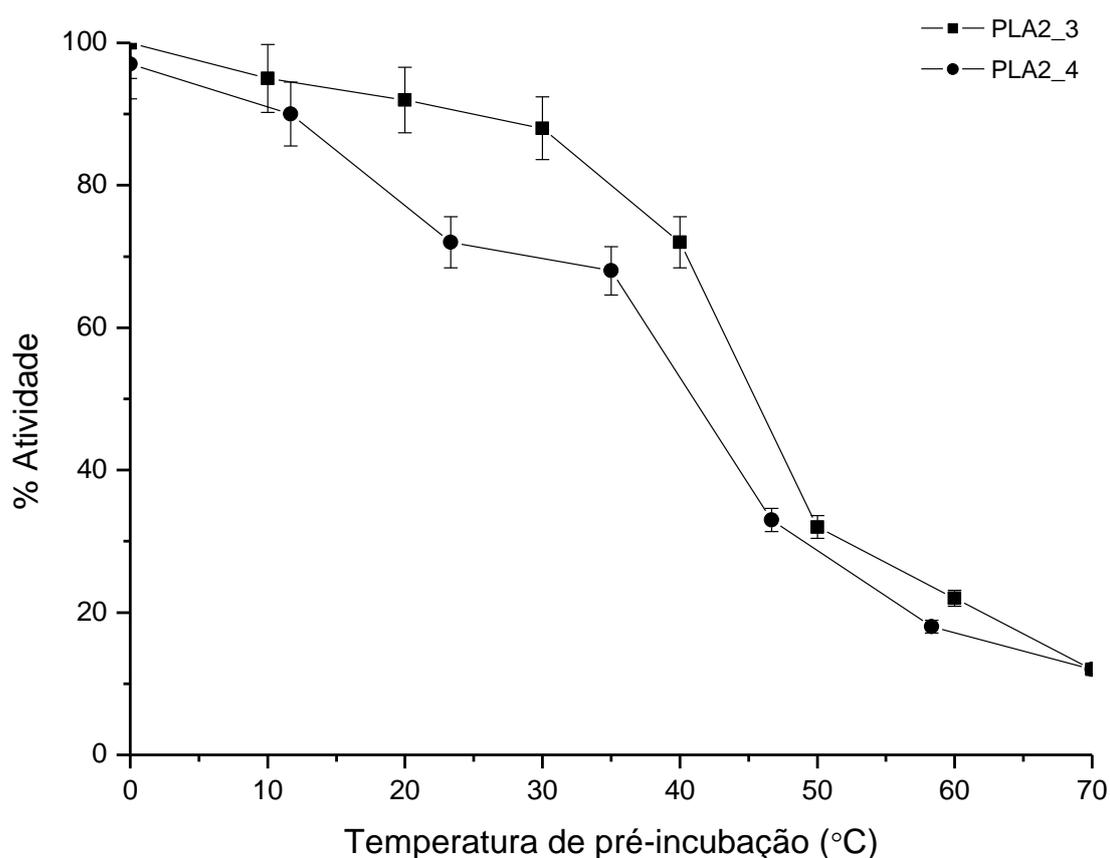


Figura 16. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática. As enzimas foram pré-incubadas em várias temperaturas (0-70°C) durante 2 horas. Após a incubação, o ensaio foi realizado em pH 8,5, na temperatura de 37°C, utilizando gema de ovo como substrato na presença de CaCl_2 .

As fosfolipases A_2 desempenham diversas funções celulares, como manutenção dos fosfolípidios de membrana, produção de prostaglandinas e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular e contração muscular. São responsáveis por catalisar a hidrólise de fosfolípidios de membrana, especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolípidos, levando à formação de lisofosfolípidos e ácidos graxos livres. Esta reação é dependente de cálcio e facilita a quebra de estruturas de membranas e a consequente dispersão da peçonha (Kini, 1997).

Tabela 3. Efeitos de íons na atividade enzimática. O ensaio foi realizado em pH 8,5, na temperatura de 37°C, utilizando gema de ovo como substrato na presença de cada composto a ser testado. Para testar o EDTA, o ensaio foi realizado na presença de 10mM CaCl₂.

Íon	Atividade Relativa (%)	
	PLA2_3	PLA2_4
10mM FeSO ₄	40	45
10mM HgCl ₂	62	63
10mM MgSO ₄	100	100
10mM CuSO ₄	75	72
10mM ZnSO ₄	88	82
10mM MnSO ₄	100	100
10mM CaCl ₂	100	100
100mM CaCl ₂	43	41
200mM CaCl ₂	21	25
25mM EDTA	100	100
100mM EDTA	83	80

Ramanaiah *et al.* (1990) purificaram uma fosfolipase A₂ a partir da peçonha de *Heterometrus fulvipes*, com massa molecular de 16 kDa, com pH ótimo de atividade de 7,4 e em com temperatura de 50°C. A atividade desta enzima foi potencializada por Ca²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺ e inibida por Hg²⁺ e EDTA.

Mais recentemente Valdez-Cruz *et al.* (2007) purificaram uma fosfolipase dependente de cálcio da peçonha do escorpião *Anuroctonus phaiodactylus*, a qual foi denominada phaiodactilipina. Esta fosfolipase foi capaz de causar inflamação muscular em camundongos, atividade hemolítica em eritrócitos humanos e retardou o tempo de coagulação sanguínea. Schwartz *et al.* (2008), em um estudo dos componentes da peçonha do escorpião *Opisthacanthus cayaporum* identificaram a presença de duas fosfolipases com massa molecular de aproximadamente 14 kDa e Garcia-Gomez *et al.* (2011) demonstrou que a peçonha de *Rhopalurus junceus* também exibe atividade fosfolipásica. Na peçonha de *Hadruroides lunatus*, Oliveira-Costal (2013) identificou massas moleculares de 11 e 13 kDa, correspondentes a massas de fosfolipase.

Na peçonha de *Scorpio maurus* uma fosfolipase (Sm-PLVG), com atividade hemolítica em eritrócitos humanos, de coelhos e de ratos foi purificada e caracterizada. A massa molecular foi de 17 kDa, composta por uma cadeia longa e uma curta estabilizadas por pontes dissulfeto (Louati *et al.*, 2013). Uma fosfolipase com importante atividade antiangiogênica, com massa molecular de 14 kDa, denominada hemipilina, foi isolada a partir da peçonha de *Hemiscorpius lepturus*. Com estrutura heterodimérica, esta enzima não demonstrou atividade hemolítica e neurotóxica, porém mostrou ser eficaz no processo de bloqueio da angiogênese *in vitro* e *in vivo* (Jridi *et al.*, 2015). Em um estudo analisando a peçonha de seis espécies de escorpiões, em quatro delas, *Androctonus amoreuxi*, *Grosphus grandidieri*, *Hottentotta gentili* e *Pandinus imperator* foram identificadas atividade de fosfolipase A₂ (Estrada-Gómez *et al.*, 2017).

Através de técnicas de transcrito, algumas fosfolipases têm sido relatadas nas peçonhas de *Tityus serrulatus* (Alvarenga *et al.*, 2012), *Hemiscorpius lepturus* (Kazemi-Lomedasht *et al.*, 2017). Na peçonha de *H. gerstchi*, uma fosfolipase A₂ foi identificada a partir da biblioteca de cDNA a qual foi denominada ScpPLA₂, constituída de duas subunidades, sendo a maior composta por 105 resíduos de aminoácidos, enquanto a subunidade menor possui entre 18 e 27 resíduos de aminoácidos. A forma heterodimérica foi estabilizada por uma ponte dissulfeto entre as cadeias. ScpPLA₂ foi expressa a partir de uma única mensagem a partir da qual o propeptídeo N-terminal, um penta ou hexapeptídeo e uma região C-terminal curta foram retirados para chegar à molécula madura. A atribuição da sequência da ScpPLA₂ foi baseada no alinhamento múltiplo de sequências já conhecidas de outras fosfolipases (Schwartz *et al.*, 2007).

De acordo com a massa molecular, estrutura primária, localização e requerimento de cálcio para sua atividade enzimática, as fosfolipases A₂ são classificadas em quatro grupos principais: PLA₂ secretadas, PLA₂ citosólicas, PLA₂ cálcio independente e fatores de ativação plaquetária (Kini, 1997; Six e Dennis, 2000). As PLA₂ secretadas são as mais comuns e têm como característica baixa

massa molecular, entre 13 e 15 kDa, grande quantidade de pontes dissulfeto e sítio catalítico dependente de cálcio. Peçonhas ofídicas possuem grande quantidade de PLA₂ secretadas e, nestas peçonhas as fosfolipases estão envolvidas em uma ampla variedade de efeitos biológicos devido à sua capacidade de interferir em vários processos farmacológicos dentre eles efeitos miotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, atividade hemolítica e inflamatória, ação sobre canais iônicos e efeitos anticoagulantes (Bustillo *et al.*, 2015; Jridi *et al.*, 2015; Damostraran *et al.*, 2016)

As peçonhas descritas nas peçonhas escorpiônicas também estão classificadas dentro do grupo das fosfolipases secretadas e estão envolvidas nos processos inflamatórios, apoptose e captura da presa (Louati *et al.*, 2013; Jridi *et al.*, 2015). Neste estudo identificou-se e caracterizou-se duas fosfolipases na peçonha de *Hadirus gerstchi*, com massas moleculares de 14.458 Da e 11.970 Da, as quais foram nomeadas como PLA2_3 e PLA2_4, respectivamente. As duas enzimas demonstraram importante atividade hemolítica e edematogênica, sendo que PLA2_3 parece ser ligeiramente mais ativa. Apesar de não ser considerado um escorpião de interesse médico, *H. gertschi* apresenta uma peçonha interessante no ponto de vista biotecnológico, uma vez que apresenta compostos que possam ser utilizados como ferramentas farmacológicas.

Capitulo II
ANÁLISE ENZIMÁTICA DA PEÇONHA DE
Potamotrygon falkneri

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Arraias

Os peixes constituem quase metade do número de vertebrados conhecidos, com aproximadamente 28.000 espécies descritas, contidas em 62 ordens e 515 famílias. Cerca de 5% destas espécies, são conhecidas como peçonhentos e/ou venenosos por sua capacidade de causar envenenamentos em humanos, tanto na água doce como em águas marinhas, dentre eles baiacu, arraias, peixe-escorpião, peixe-pedra, peixe-sapo, bagres, mandis, peixe-leão (Nelson, 2006). As notificações ficam em torno de 1.500 acidentes com arraias (*Dasyatis* spp) e 300 acidentes com peixe-escorpião (*Scorpaena* spp) nos Estados Unidos, enquanto centenas de acidentes com peixes-aranha (*Trachinus* sp) são registrados no Reino Unido. O acidente com peixe-pedra (*Synanceja* spp) é frequente no Sudeste Asiático. O acidente com peixe-leão (*Pterois* spp e *Dendrochirus* spp), peixe ornamental, é muito comum entre aquaristas (Warrell, 2012).

No Brasil, os principais peixes causadores de acidentes humanos são as arraias marinhas (*Dasyatis guttata*, *Dasyatis americana*, *Gymnura micrura*), arraias fluviais (*Potamotrygon falkneri*, *Potamotrygon motoro*), os bagres (*Bagre bagre*, *Bagre marinus*), mandis (*Pimelodella brasiliensis*, *Pimelodus maculatus*), peixe-escorpião (*Scorpaena brasiliensis* e *Scorpaena plumeri*), niquim ou peixe-sapo (*Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne amazonica*) (Haddad Jr, 2003; Facó et al., 2005).

As arraias pertencem à Classe Chondrichthyes e Subclasse Elasmobranchi. Estão distribuídas em 22 famílias, com 535 espécies descritas, sendo a grande maioria encontrada em águas salgadas. O esqueleto destes animais é cartilaginoso, possuem o corpo achatado dorsoventralmente, com grandes nadadeiras peitorais. Os olhos e espiráculos estão localizados no topo da cabeça, e a boca e fendas branquiais estão posicionadas na região ventral do corpo (Figura 17) (Compagno, 1999).

Em águas brasileiras seis famílias são consideradas de interesse médico: Urolophidae, Dasyatidae, Myliobatidae, Rhinopteridae, Gymnuridae e Potamotrygonidae. A Família Urolophidae (araias redondas) engloba araias de hábitos predominantemente bentônicos e costeiros, tamanho relativamente pequeno, arredondado. Duas espécies do gênero *Urotrygon* possuem ocorrência registrada para alguns pontos do litoral do Brasil, sobretudo no norte e nordeste (Nunes *et al.*, 2005).



Figura 17. Espécime de *Potamotrygon* sp. Foto: Enrico Richter (2010)

As araias da Família Dasyatidae (araias chicote) estão distribuídas em cerca de dez espécies conhecidas também como “araias-prego”, “araias-lixia” ou “araias-manteiga”. Apresentam formato corporal romboide, piramidal. Algumas destas espécies possuem ampla distribuição ao longo da costa brasileira, enquanto outras são endêmicas. Sua ocorrência normalmente está associada a recifes e regiões estuarinas, onde a condição eurialina da maioria das espécies permite sua permanência em áreas com consideráveis variações de salinidade, como manguezais e desembocaduras de rios (Gomes *et al.*, 2000).

As “araias-borboleta”, pertencentes à Família Gymnuridae são assim chamadas por possuírem grandes nadadeiras peitorais, dando a elas um aspecto de borboleta. O gênero *Gymnura* possui duas espécies de ocorrência descrita para

a costa brasileira. As famílias Myliobatidae (araias-chita) e Rhinopteridae (araias-ticonha) possuem hábitos predominantemente pelágicos, e são encontradas ao longo de toda a costa brasileira, próximo a recifes ou formações rochosas e cabeceiras de estuários, onde podem ser vistas nadando próximas à superfície (Lessa *et al.*, 2002).

Na água doce, as araias são representadas pela família Potamotrygonidae, constituindo um grupo interessante de elasmobrânquios, uma vez que possuem distribuição restrita aos principais sistemas fluviais da América do Sul. Possui três gêneros reconhecidos, *Potamotrygon*, *Paratrygon* e *Plesiotrygon*, sendo que o primeiro possui 18 espécies válidas e os demais estão descritas apenas uma espécie cada gênero (Carvalho *et al.*, 2003).

1.2. Aparato de peçonha das araias

Na maioria dos peixes, o aparelho produtor da peçonha consiste de espinhos ou ferrões localizados nas áreas dorsal, peitoral, opercular, pélvica, anal e caudal. Acredita-se que o desenvolvimento do aparelho de peçonha, nestes animais, é relativamente recente, considerando que a maioria dos animais peçonhentos possui um aparato de liberação da peçonha mais desenvolvido do que os encontrados em peixes (Maretic, 1988). Além do aparelho de peçonha, muitas espécies de peixes são capazes de secretar substâncias na sua pele, conhecidas como ictiocrinotoxinas, que repelem ou incapacitam outros animais marinhos, e ainda podem proteger os peixes contra uma grande variedade de microrganismos (Klaassen e Watkins, 1999).

Halstead e Bunker (1953) classificam o aparato de peçonha das arraias em quatro tipos, de acordo com sua adaptabilidade e capacidade de defesa (Figura 18). O primeiro, Gimnurídeo, menos desenvolvido, caracteriza-se por um ferrão pequeno, não ultrapassando os 2,5 cm de comprimento, geralmente situado no terço proximal da cauda, a qual é cilíndrica, afilada, e, geralmente reduzida em tamanho (Figura 18A). No segundo tipo, Miliobatídeo, o ferrão está situado na parte proximal do terço basal da cauda e é moderado em tamanho, podendo atingir até 12 cm de comprimento. A cauda é cilíndrica e afunila em longa cauda em forma de chicote (Figura 18B).

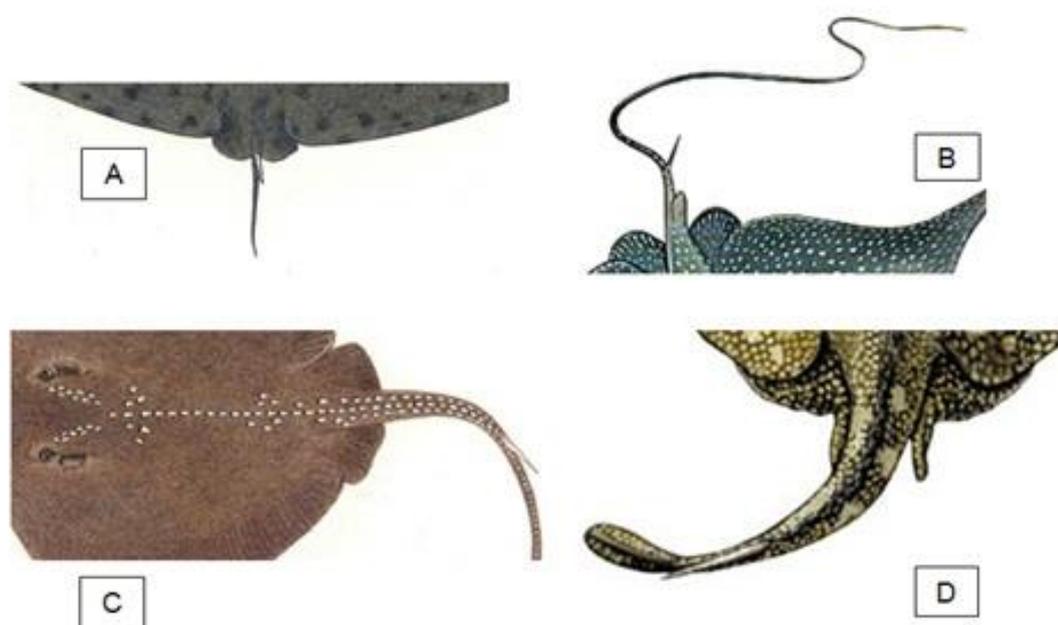


Figura 19. Tipos anatômicos dos ferrões de arraias. (A) Tipo Gimnurídeo. (B) Miliobatídeo. (C) Dasiatídeo. (D) Urolofídeo. Adaptado de Halstead e Bunker (1953).

O terceiro tipo de aparelho venenífero das arraias é o tipo Dasiatídeo, o qual é constituído por um ferrão de tamanho moderado a grande, podendo atingir até 37 cm de comprimento, localizado na porção distal ou mediana da cauda que é deprimida proximamente ao ferrão, tornando-se cilíndrica a afilada na parte distal terminando em longa cauda em forma de chicote (Figura 18C). No quarto e último tipo, o Urolofídeo, a cauda é relativamente curta, muscular, deprimida próximo ao

ferrão e torna-se comprimida distalmente. O ferrão fica localizado no terço médio ou distal da cauda e tem tamanho moderado, geralmente superior a 5 cm de comprimento (Figura 18D). A poderosa estrutura muscular da cauda e a localização distal do ferrão torna este aparato de peçonha altamente eficaz, defensivamente.

O ferrão é composto de um centro de vasodentina, em forma de "T", coberto por uma fina camada de esmalte e tegumento, constituída por duas camadas: a interna ou derme, que consiste de tecido conjuntivo areolar e canais vasculares; e a camada externa ou epiderme, composta de epitélio escamoso modificado (Figura 19). É serrilhado lateralmente, sendo por isso denominada de margem dentada. Medianamente a esta, na face ventral do ferrão, há um entalhe longitudinal, chamado de ranhura ventrolateral, dentro da qual há uma lâmina de tecido acinzentado constituído de epitélio glandular e vasos sanguíneos, descrita como a área produtora da peçonha. A superfície dorsal do espinho é marcada por vários sulcos longitudinais rasos, que são normalmente mais pronunciados na porção basal, desaparecendo distalmente (Halstead *et al.*, 1990).

Porta (1905) foi o primeiro a identificar o que seria as glândulas de peçonha das arraias, descrevendo-a como uma área de tecido conjuntivo frouxo areolar. Alguns anos mais tarde, Fleury (1950) demonstrou que a peçonha era liberada a partir de glândulas exócrinas, através de canais excretores dentro dos espaços interdentiniais. Estes achados foram confirmados por Ocampo *et al.* (1953) e Halstead *et al.* (1955), em uma descrição da organização geral do tecido que recobre o ferrão da arraia *Urolophus helleri*, sugerindo que, já que não há algum sistema complexo de inoculação da peçonha, a injeção da peçonha provavelmente acontece por um "tipo de lise holócrina".

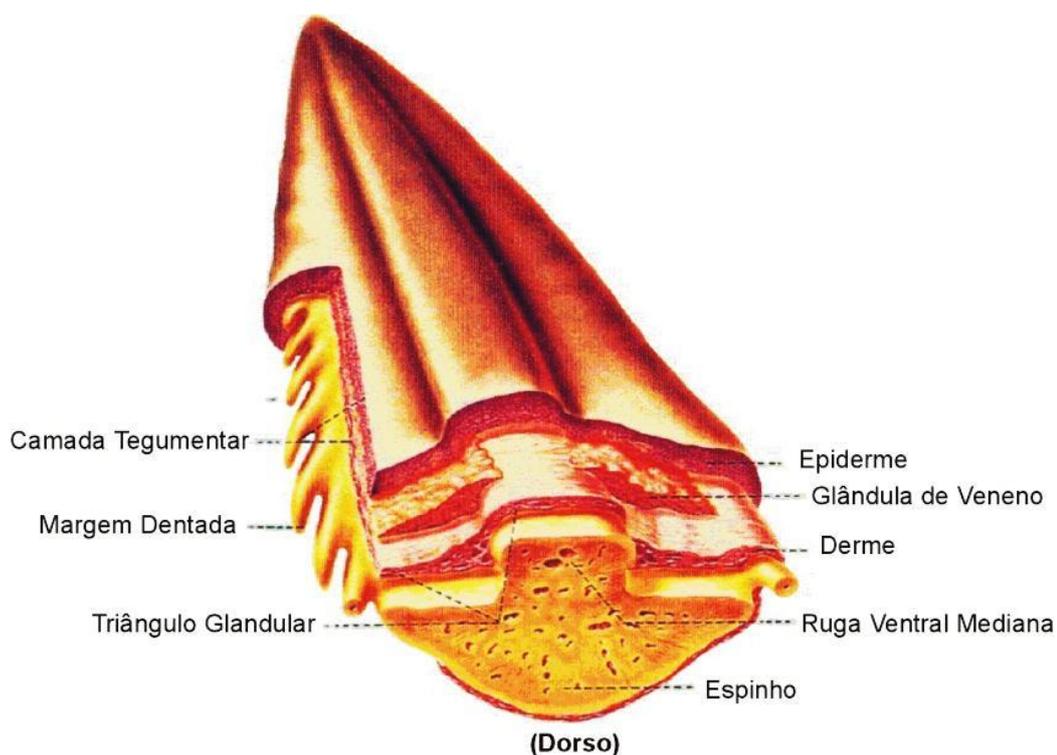


Figura 19. Corte transversal mostrando a área produtora do ferrão (modificado de (Halstead *et al.*, 1990))

Smith *et al.* (1974) trabalhando com ferrões de *Dasyatis sabina*, verificaram que o epitélio glandular consiste de células completamente diferenciadas, separadas do meio externo pela epiderme, a qual é uma camada entremeada com células provavelmente envolvidas na secreção de muco. Micrografias eletrônicas não evidenciaram glândulas holócrinas, como previamente propostas ou outro tipo de liberação do material celular, mas mostraram que todas as células do tecido glandular do ferrão são similares em estrutura, sugerindo que sejam diferenciadas após completarem seu papel secretório.

Estudos mais recentes comparando a morfologia do tecido secretor em arraia marinha e dulcícolas demonstraram que nos ferrões das espécies marinhas *Dasyatis guttata*, *Aetobatus narinari*, *Hymantura walga* e *Pastinachus sephen*, a epiderme apresenta células especializadas, localizadas principalmente dentro da ranhura ventrolateral ou ao redor desta. Já nas espécies dulcícolas,

Potamotrygon falkneri, *P. orbignyi* e *P. leopoldi*, as células especializadas formas camadas em torno de todo o ferrão, demonstrando o citoplasma cheio de grânulos de secreção (Pedroso *et al.*, 2007; Dehghani *et al.*, 2010).

1.3. Aspectos Clínicos do Envenenamento por Arraias e Epidemiologia dos Acidentes

No Brasil, quatro espécies estão envolvidos com a maioria dos acidentes com arraias dulcícolas, são elas: *Potamotrygon henlei*, *P. orbignyi*, *P. scobina* e *Paratrygon aiereba*, ressaltando que esta última, é a que apresenta menor capacidade de provocar acidentes, em função da sua cauda curta e afilada, e da posição dos ferrões na mesma, o que dificulta a realização de golpes contra possíveis agressores (Silva *et al.*, 2010).

Os acidentes com arraias acontecem quando a vítima pisa sobre o dorso do animal, que geralmente está escondido sob a areia, em águas rasas. Com o estímulo, a arraia arqueia a cauda em um plano vertical acima de seu corpo e consegue atingir a vítima, geralmente no terço final da perna, tornozelo e pé (Figura 20) (Clark *et al.*, 2007). Ao introduzir o espinho na vítima e produzir a lesão, os tecidos epiteliais que envolvem o espinho são comprimidos e lançados para o tecido lesionado circundante produzindo-se, então, por via reflexa, contrações musculares, que por sua vez, comprimem os folículos e ductos provocando a secreção da peçonha em toda a superfície do sulco do espinho. Esta compressão do tecido ferido sobre as glândulas de peçonha é aumentada durante a retirada do espinho, que dilacera o tecido pelo fato de ser serrilhado (Meyer, 1997).

O sintoma característico do acidente é uma dor intensa e imediata no local da ferroadada, desproporcional ao tamanho do ferimento, que atinge o seu máximo entre 30 e 90 minutos após o acidente e pode durar até 48 horas. No ponto ferido desenvolve-se uma necrose e uma úlcera. O processo de cura é demorado, podendo chegar a 12 semanas. Após a recuperação permanece no local do ponto

ferido uma cicatriz pigmentada e um edema residual que pode perdurar por algum tempo (Garrone Neto e Haddad Jr., 2009).

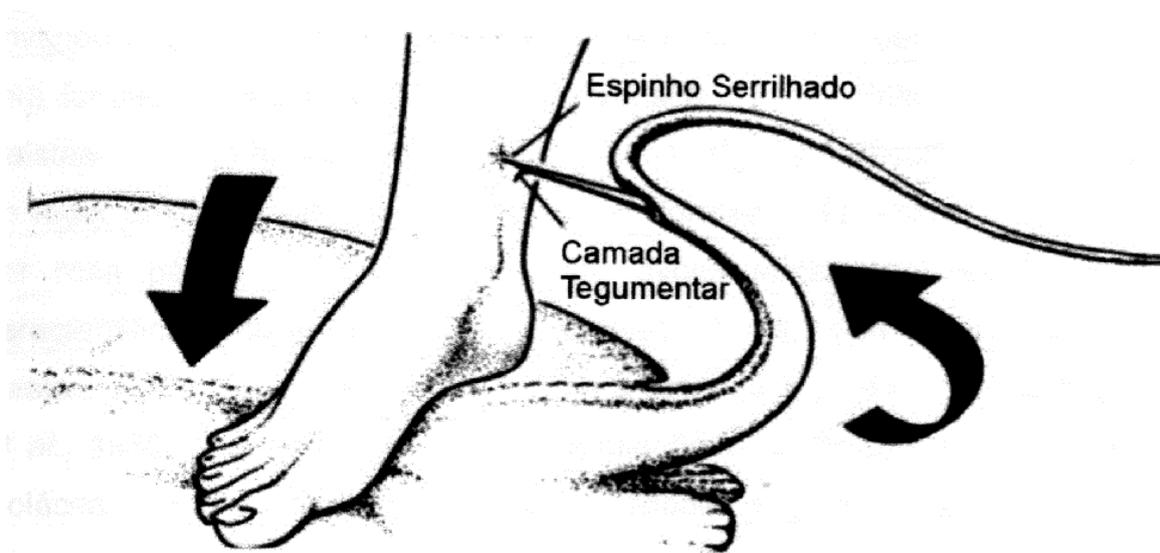


Figura 20. Mecanismo da “ferroada” por arraias (Fenner *et al.*, 1989)

Estudos comparativos entre os extratos que recobrem os ferrões de *D. guttata* e *P. falkneri*, demonstram que as manifestações clínicas observadas em animais de laboratório foram mais intensas nos animais expostos à peçonha das arraias dulcícolas do que os provenientes de arraias marinhas, sendo que o mesmo foi observado no atendimento às vítimas de acidentes por arraias (Barbaro *et al.*, 2007; Haddad Jr. *et al.*, 2013).

A epidemiologia do acidente com arraias dulcícolas envolve uma característica muito interessante no que se refere a sazonalidade dos acidentes. Em rios onde há, claramente, um período de enchente e estiagem, durante este último, quando ocorre grande procura dos balneários fluviais para atividades de banho e pesca, forma-se um cenário favorável para a ocorrência de acidentes. Na bacia fluvial onde estão distribuídas as arraias, esses acidentes acontecem principalmente no período entre maio e outubro. Entretanto, nestes mesmos rios, onde há represamento para a construção de barragens de usinas hidrelétricas, nas proximidades destas represas, com a construção de praias e ilhas artificiais, onde

a prática da pesca, nado e esportes náuticos acontecem tanto no período de enchente como de estiagem, os acidentes com arraias permanecem mais uniformemente distribuídos durante todos os meses do ano (Haddad Jr *et al.*, 2004).

1.4. Características da peçonha das arraias dulcícolas

As primeiras investigações com a peçonha de arraias foram realizadas por Russell (1953), que identificou a presença de polipeptídeos de alta massa molecular, serotonina e fosfodiesterase no epitélio que recobre os ferrões de arraias marinhas. Mais tarde, em 1954, Russell e Van Harreveld demonstraram os efeitos cardiovasculares da peçonha de *Urobatis helleri*. Posteriormente, Rodrigues (1972) isolou um princípio ativo da peçonha de *Potamotrygon motoro*, com atividade colinérgica sobre o íleo de cobaia e atividade anti-hipertensiva em ratos.

Após um longo período sem qualquer estudo sobre o tema, alguns trabalhos foram publicados. Alguns identificaram atividade enzimática na peçonha de *P. falkneri* e *P. motoro* como fosfolipases, fosfatases ácidas, hialuronidases, atividades proteolíticas sobre caseína, gelatina e elastina (Magalhães, 2001; Barbaro *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008). Atividades edematogênica, inflamatória e proteolítica foram observadas nas peçonhas de várias espécies como *P. falkneri*, *P. motoro*, *P. scobina*, *P. orbignyi* e *P. henlei* (Magalhães *et al.*, 2006).

Conceição e colaboradores (2006) descreveram o isolamento, caracterização bioquímica e sequência de um peptídeo, o qual foi denominado de Orpotrin, a partir da peçonha de *P. orbignyi*, que se mostrou efetivo na microcirculação, causando forte vasoconstrição. Estes mesmos autores, mais tarde, identificaram e isolaram o Porflan, da mesma espécie de arraia, que parece interagir com os fosfolipídios de membrana, sugerindo envolvimento direto no processo inflamatório do envenenamento (Conceição *et al.*, 2009).

Trabalhos realizados com peçonhas de animais aquáticos, especialmente peixes, têm demonstrado que elas representam uma ampla fonte de substâncias com distintas atividades farmacológicas (Church e Hodgson, 2002; Barbaro *et al.*, 2007), porém os estudos ainda são em pequeno número e pouco consistentes, devido ao fato das dificuldades encontradas para obtenção das amostras, relacionadas ao risco de captura do animal, extração da peçonha, que geralmente é obtida em pequenas quantidades de amostras para análise e ainda dificuldades de transporte e armazenamento.

Considerando que o acidente com peixes peçonhentos no Brasil parece estar bem caracterizado, em termos de sintomas mais comuns, dentre eles a dor intensa, processos inflamatórios graves, e os tipos de peixes que mais causam estes acidentes, mas por outro lado que a fisiopatologia do envenenamento ainda é pouco conhecida, uma vez que os componentes envolvidos nos sintomas apresentados ainda estão bem definidos e caracterizados, o presente trabalho se propõe a contribuir para o conhecimento dos componentes que possam estar envolvidos na fisiopatologia do envenenamento por arraias *Potamotrygon falkneri*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Identificar as atividades enzimáticas presentes nas peçonhas da arraia *Potamotrygon falkneri*, visando entender os mecanismos fisiopatológicos desencadeados após os acidentes, dando subsídios para os mecanismos de ação dos componentes presentes nesta peçonha.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as atividades enzimáticas de hialuronidase, proteases, 5'nucleotidase, fosfolipase, fosfodiesterase, L-aminoácido oxidase, collagenase, elastase, atividade fibrinogenolítica no extrato bruto do ferrão de *Potamotrygon falkneri*;
- Relacionar as atividades enzimáticas identificadas com os sintomas identificados no envenenamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração da peçonha de *Potamotrygon falkneri*

Para obtenção das peçonhas de *Potamotrygon falkneri*, os espécimes foram coletados no alto curso do Rio Paraná, no município de Três Lagoas-MS, por meio de pesca subaquática. Os ferrões então foram extraídos manualmente, com o auxílio de um bisturi, e os animais soltos novamente na água. Após a retirada, os ferrões foram colocados em recipientes térmicos, com gelo seco, para manutenção do tecido que contém a peçonha e enviados ao laboratório para processamento. No laboratório, o ferrão foi raspado e o material obtido macerado e diluído em tampão PBS (solução tamponada com fosfato), pH 7,0 e, em seguida centrifugado a 12.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi então separado em alíquotas e armazenado sob congelamento a -80°C até o momento das análises.

3.2. Dosagem de proteínas

A concentração total de proteínas foi realizada pelo método de (Lowry *et al.*, 1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. Cinco microlitros do extrato da peçonha bruta foram adicionados a 1,0 mL da solução "C" reagente constituída de 90% de solução "A" (carbonato de sódio 2%, tartarato de sódio 0,05%, diluídos em hidróxido de sódio 0,1 M) e 10% de solução "B" (sulfato de cobre 0,1% diluído em água destilada). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se 100 µL de Reagente de Folin 1 N. Depois de 45 min. em temperatura ambiente, a leitura da absorbância das amostras foi avaliada a 750 nm. O parâmetro do total de proteínas será utilizado para o cálculo das atividades enzimáticas específicas.

3.3. Fracionamento por cromatografia líquida

Vinte microlitros (500 µg de proteína) da peçonha diluída em PBS, foram aplicadas em coluna de exclusão molecular, BIOSEP-2000 (300 x 7,8 mm), acoplada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência marca Shimadzu, equilibrada com tampão PBS, em um fluxo de 0,3 mL/min, coletando-se 0,5 mL por tubo. A absorvância das amostras foi monitorada a 280 e 214 nm.

Com a finalidade de identificar as atividades enzimáticas presentes no perfil cromatográfico, as frações cromatográficas coletadas foram submetidas aos ensaios de atividade enzimática.

3.4. Atividade enzimática de fosfolipase

Foram utilizados dois métodos para dosagem de fosfolipase. O primeiro baseado no método de Marinetti (1965), onde a mistura de reação contém 200 µL de suspensão de gema de ovo (2 mg/mL) em NaCl 150 mM, pH 6,8 e 20 µL de cada amostra. Todos os tubos foram incubados durante 30 min. em temperatura ambiente e, logo após a diminuição da turbidez medida em espectrofotômetro a 925 nm. A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima capaz para produzir um decréscimo de 0,01 unidades de absorvância por mg de proteína.

O segundo método utilizado foi o da hemólise indireta, de acordo com Gutiérrez *et al.* (1988). Dez microlitros das amostras foram misturadas a uma mistura de reação contendo 15 µL de CaCl₂ 10mM, 170 µL de eritrócitos humanos 2% diluídas em PBS e 7 µL de emulsão de gema de ovo a 2 mg/mL. Após incubação por 30 min a 37°C, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 2000 rpm e, logo após, a absorvância do sobrenadante medida a 540 nm em espectrofotômetro. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de provocar um aumento de 0,001 unidades de absorvância por miligrama de proteína.

3.5. Atividade hialuronidásica

Vinte microlitros das foram adicionadas à mistura de reação contendo 200 μL de tampão acetato 200 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM e 50 μL de ácido hialurônico (Sigma H-0902) (0,5 mg/ml) diluído no mesmo tampão. Um tubo branco contendo todos os reagentes, com exceção da peçonha foi preparado paralelamente (concentração de ácido hialurônico inicial). A reação então foi incubada durante 15 minutos a 37°C e, logo após, interrompida pela adição de 500 μL de brometo de cetiltrimetilamônio 2,5% (CTAB) (Aldrich 85.582-0) em NaOH 2%. Após 10 minutos, em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 400 nm. A atividade específica foi expressa em TRU, a qual é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 50% do ácido hialurônico inicial por mg de proteína Ferrante (1956).

3.6 Atividade de 5'nucleotidase

Dez microlitros das amostras de peçonha foram adicionadas à solução reagente contendo 150 μL de glicina-NaOH 200 mM pH 9,0, 10 μL de MgSO_4 , 15 μL de 5'-AMP. Os tubos serão incubados por 15 min a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 200 μL de água e 400 μL de TSCR (Tausky-Shorr Color Reagent). Após 10 minutos em temperatura ambiente, a absorbância das reações foi medida a 660 nm. A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmoles de Pi por mg de proteína. A quantidade de Pi liberada foi calculada através de curva padrão utilizando-se solução padrão de fósforo inorgânico. Será realizada de acordo com o método de (Heppel e Hilmoe, 1951).

3.7. Atividade enzimática de fosfodiesterase

Dez microlitros das amostras foram adicionadas a uma solução reagente contendo 300 μL de tampão tris-HCl 100 mM, pH 8,9, 400 μL de bis (p -nitrofenil)

fosfato (Sigma N2877) 1 mM e 250 μ L de água destilada. A reação foi incubada a 37°C durante 60 min e a reação interrompida com a adição de 1,0 mL NaOH 0,05 M. A absorbância será determinada a 400 nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mole de p-nitrofenol por mg de proteína. A quantidade de p-nitrofenol liberada foi calculada através de curva padrão utilizando-se p-nitrofenol (Sulkowsky *et al.*, 1963).

3.8. Atividade enzimática de L-aminoácido oxidase

O ensaio foi realizado segundo o proposto por Weissbach *et al.* (1960). Dez microlitros das amostras foram adicionadas a 890 μ L de Tris-HCl 100mM com pH8,0, 100 μ L de L-Kyrunerine 5mM. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e a absorbância medida á 332 nm. A atividade específica foi determinada pela quantidade de enzima capaz de produzir um aumento de 0,001 unidade de absorbância por mg de proteína.

3.9. Atividade enzimática de collagenase

A atividade proteolítica sobre azocoll (Sigma-Aldrich) será determinada de acordo com o método de Chavira Jr *et al.* (1984) no qual 20 μ L da peçonha bruta e das amostras coletadas na cromatografia foram adicionadas a 1,0 mL de azocoll (A4341), na concentração de 5 mg/mL, diluído em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5. Após um período de incubação de 3 horas a 37°C, os todos os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm, durante 10 min, e a absorbância do sobrenadante analisada a 510 nm. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de provocar um aumento de 0,001 unidades de absorbância por mg de proteína.

3.10. Atividade proteolítica sobre caseína

A atividade caseinolítica foi analisada utilizando-se o método de Lomonte e Gutierrez (1983). Dez microlitros de cada amostra foram adicionados a 200µL de caseína 1%. A reação será incubada durante 30 minutos a 37°C e, logo após, será interrompida adicionando-se 400µL de ácido tricloroacético 5%. Após 30 minutos em temperatura ambiente, os tubos serão centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm e a absorbância medida a 280nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento de 0,001 unidade de absorbância por miligrama de proteína.

3.11. Atividade proteolítica sobre elastina

Será determinada utilizando-se Elastin-Congo Red como substrato, de acordo com Naughton e Sanger (1961). O substrato foi ressuspenso em tampão PBS em uma concentração de 1 mg/mL. Então 100 µL desta suspensão foram incubados com 20 µL das amostras durante 18 horas a 37°C. Após este período, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min e a absorbância do sobrenadante lida a 490 nm. A atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de provocar um aumento de 0,001 unidade de absorbância por mg de proteína.

3.12. Atividade proteolítica sobre azocaseína e azoalbumina

Dez microlitros das amostras foram misturadas a 500 µL de uma solução de azocaseína e azoalbumina (1 mg/mL) em tampão PBS. A reação foi incubada durante 150 minutos a 37°C e, logo depois, interrompida com a adição de 50µL de ácido tricloroacético 0,5 M gelado. Após centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos, a absorbância foi medida a 342 nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,001 unidade de absorbância por mg de proteína (Silva Jr e Aird, 2001).

3.13. Atividade fibrinogenolítica

A capacidade de clivar o fibrinogênio foi determinada por SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida 12%. Duzentos microlitros de fibrinogênio bovino (2 mg/mL) dissolvidos em salina foram incubados a 37°C com 10 das amostras durante 60 min. Decorrido este tempo 20 µL da reação foram misturados a uma solução desnaturante para preparar a amostra para SDS-PAGE (SDS 4%, glicerol 20% e 2-mercaptoetanol 20%). Como controle negativo de atividade será utilizado fibrinogênio incubado durante 24 horas sem adição das amostras e como controle positivo, utilizou-se uma amostra de *Bothrops alternatus* em uma concentração de 100 µg/mL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento da peçonha bruta de *Potamotrygon falkneri* em coluna BIOSEP-2000 (300 x 7,8 mm), resultou em 5 frações cromatográficas as quais foram eluídas entre os tempos de retenção de 15-47 minutos (Figura 21).

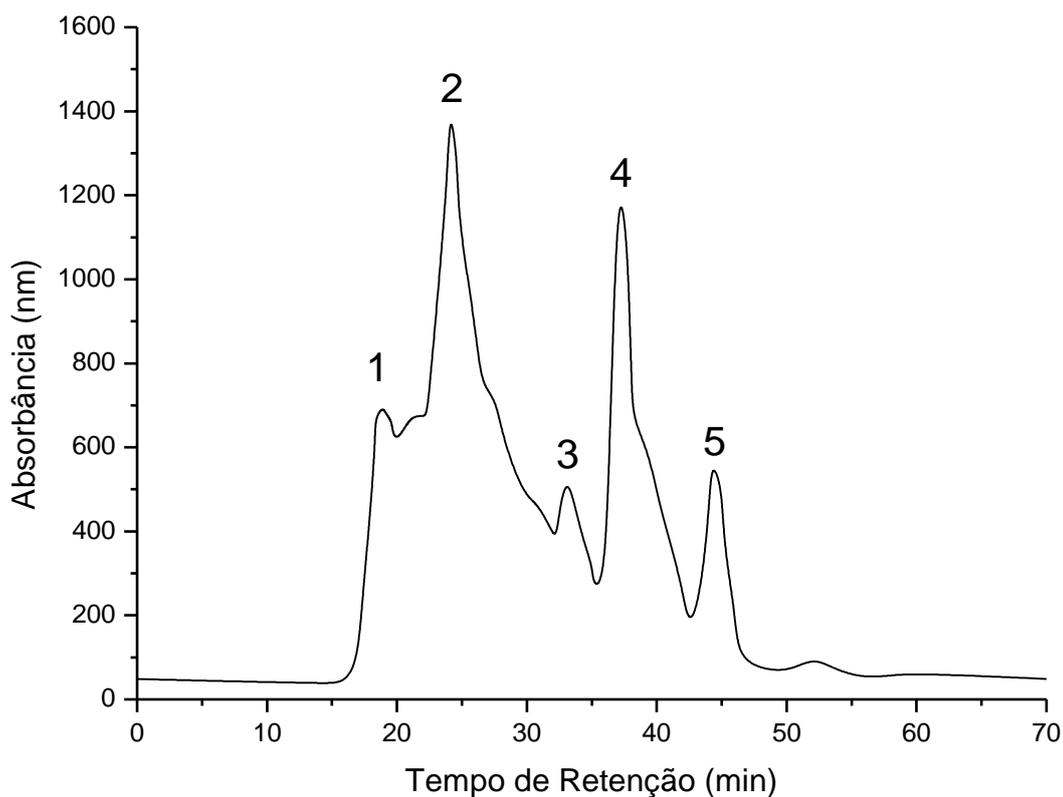


Figura 21. Perfil cromatográfico da peçonha de *Potamotrygon falkneri* em coluna BIOSEP-2000 (300 x 7,8 mm).

As frações cromatográficas foram coletadas manualmente e submetidas aos ensaios enzimáticos propostos no item Material e Métodos. Os resultados mostraram que a peçonha de *Potamotrygon falkneri* exibe atividades enzimáticas de protease, fosfolipase e 5'nucleotidase, e não foi capaz de agir sobre os substratos das enzimas de fosfodiesterase e L-aminoácido oxidase. Na Tabela 4

está descrito os resultados do extrato bruto e a distribuição das atividades de acordo com as frações cromatográficas coletadas.

As atividades de hialuronidase e 5'-nucleotidase ficaram concentradas nas frações cromatográficas 1 e 2, enquanto as proteases (elastase, colagenase, caseinolítica, azoalbumina e azocaseína) ficam mais evidentes nas frações cromatográficas 3 a 5 e a fosfolipase nas frações cromatográficas 6 a 8. A fração cromatográfica 9 não apresentou nenhuma das atividades testadas.

Tabela 4. Atividades enzimáticas identificadas na peçonha de *P. falkneri*

Atividade Enzimática	Extrato bruto	1	2	3	4	5
Hialuronidase (TFU/mg)	$4,72 \times 10^5 \pm 0,007$	X	X	-	-	-
5'-Nucleotidase (U/mg)	$1,2 \pm 0,12$	X	X	-	-	-
Elastase (U/mg)	$150,0 \pm 0,621$	-	X	X	X	-
Colagenase (U/mg)	$371,4 \pm 0,784$	-	X	X	X	-
Azocaseína (U/mg)	$323,4 \pm 0,23$	-	X	X	X	-
Azoalbumina (U/mg)	$412,2 \pm 0,15$	-	X	X	X	-
Caseinolítica (U/mg)	$275,2 \pm 0,014$	-	X	X	X	-
Fosfolipase (U/mg)	$122,8 \pm 0,012$	-	-	-	X	X
Fosfolipase A ₂ (U/mg)	$128,7 \pm 0,087$	-	-	-	X	X
Fosfodiesterase (U/mg)	ND	-	-	-	-	-
L-aminoácido oxidase	ND	-	-	-	-	-

ND – Não detectado

O envenenamento por arraias é caracterizado por um quadro local importante, no qual a dor intensa é o principal sintoma. Após alguns minutos, aparecem ao redor do ponto ferido, eritema e edema dolorido com a pressão, caracterizando a primeira fase do envenenamento. Após uma semana, apresenta-se com necrose central, porém sem formação de crosta. Produz-se, ao redor

desta, flacidez tissular e posterior formação de uma úlcera profunda de cor rosa pálida, bem recortada, que evolui lentamente.

A análise enzimática proposta neste estudo teve como base os sintomas acima apresentados, uma vez que a intensa reação inflamatória observada no acidente sugere o envolvimento de enzimas que possam degradar ou promover a degradação tecidual. A análise enzimática da peçonha de *P. falkneri* mostrou a presença de proteases que agem em vários substratos, indicando a possibilidade de existir mais de um tipo de protease e, dessa forma os resultados sugerem o envolvimento destas proteases na lesão instalada.

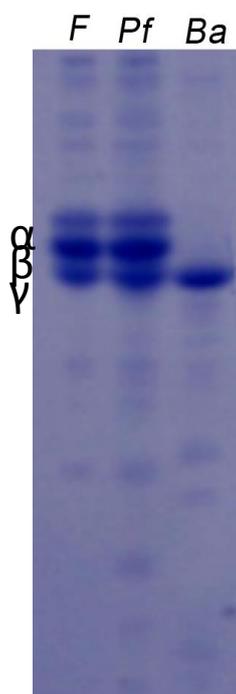


Figura 22. Atividade fibrinogenolítica de *Potamotrygon falkneri*. (F) Fibrinogênio sem adição de amostra. (Pf) Fibrinogênio incubado com peçonha de *P. falkneri*. (Ba) Fibrinogênio incubado com peçonha de *Bothrops alternatus*.

Barbaro *et al.* (2007) realizaram um estudo no qual caseína, gelatina e fibrinogênio foram adicionados à matriz de eletroforese SDS-PAGE e identificaram vários componentes com massa molecular acima de 83 kDa os quais agiram sobre os substratos citados. Neste mesmo estudo fizeram o mesmo ensaio, porém realizando uma pré-incubação com inibidores de metaloproteinases os quais não

foram capazes de inibir a atividade enzimática, o que indica que as enzimas proteolíticas presentes na peçonha de *P. falkneri* não pertencem ao grupo das metaloproteinases. Porém, Oliveira Jr. (2014) a partir do transcrito do tecido que recobre o ferrão das arraias *P. falkneri* e *P. motoro* identificou várias enzimas proteolíticas do tipo metaloproteinases dentre elas, colagenase, estromelina, macrófago elastase, enamelinases, gelatinase, epilinas, desintegrinas e caspases o que corrobora com a sintomatologia apresentada nos acidentes, especialmente no que se refere à necrose.

As metaloproteinases degradam as macromoléculas da matriz intersticial, incluindo o colágeno, a fibronectina, proteoglicana e laminina, entre outras. Coletivamente são capazes de degradar todas as proteínas componentes da matriz extracelular e das membranas basais e, dentre as conhecidas nas peçonhas animais estão as colagenases, elastases e gelatinases (Gutiérrez e Rucavado, 2000).

Neste estudo, além da atividade caseinolítica, a qual é um teste inespecífico, realizou-se análises das atividades enzimáticas de elastase e colagenase, que agem especificamente em substratos presentes na matriz extracelular, o que demonstra o envolvimento direto dessas enzimas na lesão tecidual, especialmente na necrose flácida ao redor do ferimento.

A peçonha de *P. falkneri* não foi capaz de clivar o fibrinogênio, uma vez que todas as cadeias da molécula (α , β e γ) permaneceram inalteradas, após incubação por 60 minutos (Figura 22), o que indica que a peçonha da arraia não tem atividade sobre o sistema de coagulação, corroborando com os resultados encontrados por Barbaro *et al.* (2007), nas peçonhas de *P. falkneri* e *D. guttata*, utilizando plasma humano.

Além das enzimas proteolíticas identificadas neste estudo, outra enzima que pode ter uma influência importante na fisiopatologia do envenenamento, é a hialuronidase. É a enzima que tem a maior atividade na peçonha e, em uma ação

conjunta com as enzimas proteolíticas, podem potencializar a ação local, uma vez que esta enzima é conhecida por ser um fator de dispersão que facilita a dispersão da peçonha no tecido da vítima (Duran-Reynals, 1936; Girish *et al.*, 2004; Wahby *et al.*, 2012b). Estudos recentes suportam a ideia da utilização de inibidores de hialuronidase ou ainda um soro específico para combater os efeitos desta enzima, em uma tentativa de diminuir os efeitos locais e sistêmicos do envenenamento (Girish e Kemparaju, 2006; Wahby *et al.*, 2012a)

A hialuronidase é uma enzima comumente encontrada na peçonha de várias espécies. Nas peçonhas de peixes já foi descrita em peixe-pedra e outras espécies de arraias (Poh *et al.*, 1992; Magalhães *et al.*, 2008; Madokoro *et al.*, 2011), porém estas peçonhas, em geral, exibem uma atividade muito mais alta do que nas peçonhas de outras espécies. Pukrittayakamee *et al.* (1988) relataram atividade específica de hialuronidase nas peçonhas de serpentes em uma média de 200 U/mg. Poh *et al.* (1992) identificou na peçonha de *Synanceja horrida* (peixe-pedra) uma atividade específica 6,1 U/mg. Na peçonha de *P. motoro*, a atividade hialuronidásica foi determinada em $3,61 \times 10^5$ U/mg (Magalhães *et al.*, 2008). Neste estudo identificamos atividade específica de $4,72 \times 10^5$ U/mg, corroborando com os resultados de uma atividade significativa de hialuronidase na peçonha de arraias.

Dessa forma pode se inferir que as proteases juntamente com a hialuronidase, com atividade tão alta, pode ser o principal fator atuante nos sintomas locais do envenenamento por arraias de água doce. Estudos recentes suportam a ideia da utilização de inibidores de hialuronidase ou ainda um soro específico para combater os efeitos desta enzima, em uma tentativa de diminuir os efeitos locais e sistêmicos do envenenamento (Girish e Kemparaju, 2006; Wahby *et al.*, 2012a). No caso dos acidentes por arraias, uma prática comum entre os ribeirinhos, é a lavagem do ferimento com água quente, para que a dor no local diminua e as sequelas sejam menores. Considerando que a hialuronidase é uma

enzima termolábil, essa prática comum pode causar uma diminuição nos efeitos da hialuronidase e, conseqüentemente explicar a diminuição dos efeitos locais.

Os ensaios para identificar a atividade fosfolipásica tiveram como objetivo verificar a presença de atividade fosfolipásica em geral, e também se há atividade fosfolipásica A₂, com dependência de cálcio. Os resultados obtidos indicam uma atividade fosfolipásica baixa, quando comparada às atividades encontradas em outras peçonhas especialmente as de serpentes. Magalhães (2001) analisou a peçonha de *P. motoro* e também identificou baixa atividade fosfolipásica naquela peçonha, sendo que os mesmos resultados foram encontrados por Barbaro *et al.* (2007) nas peçonhas de *P. falkneri* e *D. guttata*. Em uma análise do transcriptoma da glândula da peçonha de *P. falkneri* e *P. motoro*, identificaram-se transcritos de fosfolipase A₁, fosfolipase A₂ e fosfolipase D (Oliveira Jr., 2014).

Considerando os efeitos biológicos já identificados na peçonha de *P. falkneri*, *P. scobina* e *P. orbigny* (Magalhães *et al.*, 2006; Barbaro *et al.*, 2007), dentre eles dor, edema, necrose e atividade miotóxica e a ainda que fosfolipases geralmente estejam envolvidas nos processos inflamatórios, a presença desta enzima nas peçonhas de arraias pode inferir que ocorra participação destas fosfolipases no processo inflamatório local no acidente como já descrito para peçonhas de vespas, serpentes e aranhas (Teixeira *et al.*, 2009; Catalan *et al.*, 2011; Sukprasert *et al.*, 2013).

Russell (1953) cita a presença de serotonina e atividades enzimáticas de fosfodiesterase e 5´nucleotidase na peçonha de arraias marinhas. Entretanto, a fosfodiesterase não foi detectada na peçonha de *P. falkneri*, da mesma forma que não foi identificada na peçonha de *P. motoro* (Magalhães, 2001), que são arraias dulcícolas. Provavelmente devido a uma variabilidade interespecífica. Da mesma forma não identificamos a atividade de L-aminoácido oxidase.

A enzima 5´-nucleotidase demonstrou alta atividade, semelhante às encontradas nas peçonhas de serpentes, onde tem-se publicado alguns artigos

relatando sobre suas propriedades e funções (Ogawa *et al.*, 2009; Trummal *et al.*, 2015). Em peixes, esta enzima foi identificada, mas ainda não isolada, na peçonha de *Synanceja horrida* e *Scatophagus argus* (Khoo *et al.*, 1992; Sivan *et al.*, 2010). Sua atividade biológica tem sido relacionada à uma atividade de inibição da agregação plaquetária e alguns autores sugerem que 5'nucleotidase possa agir sinergisticamente com outras enzimas como ADPase, fosfolipases e proteases para exercer maior atividade anticoagulante (Silva Jr e Aird, 2001; Hart *et al.*, 2008).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A peçonha pode ser definida como uma secreção produzida em uma glândula especializada de um animal, sendo sua inoculação realizada através de um ferimento mínimo, que contém moléculas que perturbam os processos fisiológicos normais, para facilitar a alimentação ou a defesa do animal que a produz (Fry *et al.*, 2009). Sua função é variada e está mais comumente relacionada com a alimentação (captura e/ou digestão da presa), especialmente para serpentes, aranhas, escorpiões, e com a defesa individual ou coletiva, como ocorrem para a maioria dos peixes, equinodermos, larvas de lepidópteros.

Os componentes proteicos são a maioria na composição das peçonhas e, estes refletem sua função. Peçonhas utilizadas principalmente para defesa, como por exemplo, peixes ou abelhas, a composição é mais simples e conservada e os sintomas apresentados pelas vítimas, logo após o acidente, é a dor, enquanto que as peçonhas utilizadas na digestão, propriamente dita, a mistura proteica parece sofrer mais variações dentro de cada grupo. Essa complexidade leva a uma grande variação na composição das peçonhas em relação a sua toxicidade, e como isso, no modo de relacionamento entre as moléculas dentro dessa composição, e ainda da idade, sexo, populações de uma espécie (Casewell *et al.*, 2013).

Neste estudo fizemos uma análise enzimática geral da peçonha da arraia *Potamotryogn falkneri* e isolamos duas fosfolipases da peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi*. Filogeneticamente estes dois grupos estão distantes um do outro. Dentro da classificação zoológica, escorpiões são invertebrados, e por isso considerado mais primitivo do que as arraias, que estão dentro do grupo dos vertebrados. Porém, quando consideramos a composição das peçonhas destas duas espécies, fica claro que as peçonhas escorpiônicas são mais evoluídas, quando comparadas com as arraias, inclusive no aparato de produção da peçonha, já que possuem facilidade maior para penetração nos sistemas biológicos da vítima

e, com isto, provocar efeitos sistêmicos mais importantes. As arraias demonstraram atividades de proteases, hialuronidase e fosfolipase na composição da sua peçonha (Magalhães *et al.*, 2008; Oliveira Jr, 2014), enquanto que nos escorpiões essas enzimas ainda são pouco conhecidas, apesar de já serem descritas (Almeida *et al.*, 2002; Rokyta e Ward, 2017; Uribe *et al.*, 2017).

As fosfolipases A₂ estão amplamente distribuídas nas peçonhas animais, onde lhe são atribuídas uma variedade de funções biológicas. Com base na suas sequencias primárias, padrões de pontes dissulfeto e suas propriedades bioquímicas, as fosfolipases A₂ estão classificadas em 12 grupos. As fosfolipases A₂ das peçonhas ofídicas estão inseridas dentro dos grupos I e II, enquanto que as fosfolipases isoladas a partir das peçonhas de abelhas, escorpiões, lagartos estão incluídas dentro do grupo III, no qual estas enzimas apresentam, em sua molécula, dez cisteínas, são heterodiméricas e compostas por duas subunidades, sendo uma com cadeia longa e outra de cadeia mais curta. Fosfolipases A₂ dos grupos I, II e III são altamente semelhantes quando se analisa a ligação do Ca²⁺ no sítio ativo da enzima (Dennis *et al.*, 2011).

Ambas as peçonhas analisadas neste estudo demonstraram atividade de fosfolipase A₂ dependente de cálcio. Na peçonha de *Hadrurus*, provavelmente uma das enzimas purificadas poderá estar relacionada com a fosfolipase A₂ identificada por Schwartz *et al.* (2007), a qual demonstrou as mesmas características de outras fosfolipases já isoladas da peçonhas de outras espécies de escorpiões, ou seja, constituída por 2 subunidades, sendo uma com cadeia mais longa e outra com cadeia mais curta, estabilizadas por pontes dissulfeto, enquanto a peçonha de *P. falkneri* mostrou atividade fosfolipásica A₂, porém com atividade específica mais baixa do que as fosfolipases isoladas da peçonha do *Hadrurus gerstchi*.

Oliveira Jr (2014), em um estudo do transcrito da peçonha de *P. falkneri* e *P. motoro*, identificou dois transcritos de fosfolipase A₂, fosfolipase A₁ e fosfolipase D.

Abaixo segue um alinhamento entre as sequencias identificadas por Oliveira Jr (2014) (PF1 e PF2), as sequencias de *Hadrurus gerstchi* (PA2HAD e HG_2474) e uma fosfolipase conhecida de *Bothrops jararacussu* (PA2B1_BOTJR).

```

PA2HAD      ----MSLIIVLVISVLSADAVLSMDNELYLNLNLEPSQRSSWPVARAVRMQFSKRSEGG- 54
PF1         MKAGCLLTLSVLHGL-----VLPVDGGR- 23
PF2         ----MLGLFVLF-L-----LSAVAGSIS 18
PA2B1_BOTJR ----MRTLWIMAVL-----LVGVEGSL- 18
HG_2474     ----MSLIIVLVISVLSADAVLSMGNELYLNLNLEPSQRSSWPVARAVRMQFSKRSEGG- 54
              :  :  :
              *

PA2HAD      -ESRKMQGCQILESLNDIAREALRTPRHHTTKRISKDEMEFFEGRCISVGESERTVLGTKW 113
PF1         -LKRH-----LDQLGSMIECRVGEGRWL-----TWLDYFDYG-----CY 56
PF2         IESRN-----LIQFADLRCAIPGVN-----PFKFNNYG-----CY 49
PA2B1_BOTJR -----FELGMILQETGKNP-----AKSYGAYG-----CN 43
HG_2474     -ESRRMQGCQILESLNDIAREALRTPRYATKRISKDEMEFFEGRCISVGESERTVLGTKW 113
              . :  :
              . :

PA2HAD      CGAGNEAANYSDLGYFNNVDRCCREHHDHCDNIPAGETKYG----- 153
PF1         CGFGGQG-----QPVDVDGCCRLHDI CYGKLESKGGCHWYHSPYWTHYTWICGREQSL 110
PF2         CGLGGSG-----KPVDELDRCCQTHDYCYDDAKKKEKCKI INAPKMKHYSYTC SKGKI- 102
PA2B1_BOTJR CGVLGRG-----KPKDATDRCCYVHKCYKCLTG-----CDPKKDRYSYSWKDKTI- 89
HG_2474     CGAGNEAANYSDLGYFNNVDRCCREHHDHCDNIPAGETKYG----- 153
              ** . . : * * * * . *

PA2HAD      --LKNEGTYTMMNCKCEKAFDKCLSDISGYFTRKAVSAVKFTYFTLYGNGCYN--VKCEN 209
PF1         TCVDPRGTCARSVDCDCKKLVDCFSRSN--YNPDLRGINK-----DVMCQ 153
PF2         EC-KGNSRCGKFI CECDRQVAICFSKAK--YNSLNKGIKK-----SRCK- 143
PA2B1_BOTJR VC-GENNPCLKELCECDKAVAI CLRENLTGTYNKKYRYHLK-----PFCKK 133
HG_2474     --LKNEGTYTMMNCKCEKAFDKCLSDISGIFTEAAISAVKHLHILHFMEMPATTSNARMKD 211
              .. * . * : . * : : . *

```

Podemos identificar glicina conservada em todas as sequencias na posição 60, assim como as cisteínas para a formação das pontes dissulfeto nas posições 114-136, 135-174, 142-167, 165-202 e 207-217 em todas as sequencias apresentadas. As massas moleculares dessas enzimas foram semelhantes a outras fosfolipases comuns nas peçonhas sendo elas entre 15 e 17 kDa.

As fosfolipases A₁ pertencem ao gene das famílias das lipases pancreáticas, o qual se mantém conservado nos mais variados organismos (Carriere *et al.*, 1998). Estudos cristalográficos de lipases pancreáticas humanas, mostram que são compostas por dois domínios, um amino-(N-) e um carboxy (C-) terminais. O sítio catalítico está localizado no N-terminal e é composto por Ser, Asp e His. Foi identificada e caracterizada na peçonha de várias espécies de vespas onde tem sido considerada como o principal alérgeno e por atuar no processo inflamatório causando edema e atividade na ativação da agregação plaquetária (Sukprasert *et al.*, 2013; Soldatova e Kochoumian, 1993).

As fosfolipases D são ativadoras de sinal e por isso estão agrupadas juntamente com as fosfolipases A₂, fosfolipases C e esfingomielinases uma vez que degradam fosfolípidos que geram produtos biologicamente ativos desempenhando funções de regulação das células. Esta enzima é considerada por Magalhães *et. al.* (2013), como o principal fator envolvido na dermonecrose apresentada nos envenenamentos pela aranha *Loxosceles gaucho*. Esta enzima foi clonada e expressa em bactérias e, além de ser capaz de hidrolisar a esfingomielina, demonstrou capacidade de provocar reações locais como edema, eritema, equimoses e ainda dermonecrose, atividade hemolítica e promover a agregação plaquetária.

Desta forma pode-se considerar que, apesar de componentes comuns entre as duas espécies, especialmente no que se refere às fosfolipases. Na peçonha das araias elas podem estar diretamente ligadas a ação local do envenenamento uma vez que podem apresentar, além das proteases que têm um papel bem conhecido nas reações locais do envenenamento, outras enzimas, como fosfolipases, que podem interagir com as proteases, potencializando a ação local, enquanto que nos escorpiões, podem influenciar na reação inflamatória local, mas sua função parece ser mais importante nas reações sistêmicas.

CONCLUSÕES

- Os componentes presentes na peçonha de *Potamotrygon falkneri* contribuem significativamente para a fisiopatologia do envenenamento, considerando os sinais locais do quadro clínico.

- As duas fosfolipases presentes na peçonha de *Hadrurus gerstchi* possuem um papel fundamental no quadro inflamatório do envenenamento uma vez que causam efeito edematogênico importante.

- As fosfolipases de *Hadrurus gerstchi* possuem atividade hemolítica.

- As fosfolipases de *Hadrurus gerstchi* têm melhor efeito enzimático em pH 8 e 8,5 e em temperatura entre 35 e 40°C.

PERSPECTIVAS

- Purificar e caracterizar as enzimas identificadas na peçonha de *Potamotrygon falkneri*;
- Avaliar as atividades biológicas da peçonha de *Potamotrygon falkneri*;
- Identificar, purificar e caracterizar enzimas proteolíticas na peçonha de *Hadrurus gerstchi*;
- Identificar moléculas que possam ser utilizadas como novos modelos farmacológicos e ferramentas biotecnológicas nas peçonhas de *Potamotrygon falkneri* e *Hadrurus gerstchi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T.; Sugita, M.; Fujikura, T.; Hiyoshi, J.; Akasu, M. Giant hornet (*Vespa mandarinia*) venomous phospholipases - The purification, characterization and inhibitory properties by biscochlorine alkaloids. *Toxicon*. v. 38, n. 12, p. 1803-1816, 2000.
- Almeida, F.; Pimenta, A.; De Figueiredo, S.; Santoro, M.; Martin-Eauclaire, M.; Diniz, C.; De Lima, M. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*. v. 40, n. 7, p. 1041-1045, 2002.
- Alvarenga, É. R.; Mendes, T. M.; Magalhães, B. F.; Siqueira, F. F.; Dantas, A. E.; Barroca, T. M.; Horta, C. C.; Kalapothakis, E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. 2012.
- Barbaro, K. C.; Lira, M. S.; Malta, M. B.; Soares, S. L.; Garrone Neto, D.; Cardoso, J. L.; Santoro, M. L.; Haddad Jr, V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon*. v. 50, n. 5, p. 676-687, 2007.
- Belaunzaran, M. L.; Wilkowsky, S. E.; Lammel, E. M.; Gimenez, G.; Bott, E.; Barbieri, M. A.; Isola, E. L. Phospholipase A₁: a novel virulence factor in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. v. 187, n. 2, p. 77-86, 2013.
- Burin, S. M.; Ghisla, S.; Ouchida, A. T.; Aissa, A. F.; Coelho, M. G.; Costa, T. R.; Marsola, A. P.; Pinto-Simoes, B.; Antunes, L. M.; Curti, C.; Sampaio, S. V.; De Castro, F. A. CR-LAAO antileukemic effect against Bcr-Abl(+) cells is mediated by apoptosis and hydrogen peroxide. *Int J Biol Macromol*. v. 86, p. 309-20, 2016.
- Bustillo, S.; Garcia-Denegri, M. E.; Gay, C.; Van De Velde, A. C.; Acosta, O.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutierrez, J. M.; Leiva, L. Phospholipase A₂ enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chem Biol Interact*. v. 240, p. 30-6, 2015.
- Calvete, J. J. Structure-function correlations of snake venom desintegrins. *Curr Pharm Des*. v. 11, p. 829-835, 2005.
- Calvete, J. J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS letters*. v. 583, n. 11, p. 1736-1743, 2009.
- Carriere, F.; Withers-Martinez, C.; Van Tilbeurgh, H.; Roussel, A.; Cambillau, C., Verger, R. Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1376, 417-432, 1998.
- Carrijo, L. C.; Andrich, F.; Lima, M. E.; Cordeiro, M. N.; Richardson, M.; Figueiredo, S. G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*. v. 45, n. 7, p. 843-50, 2005.

- Carvalho, M. R.; Lovejoy, N. R.; Rosa, R. S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., *et al* (Ed.). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p.22-28.
- Casewell, N. R.; Wüster, W.; Vonk, F. J.; Harrison, R. A.; Fry, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in ecology & evolution*. v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013.
- Catalan, A.; Cortes, W.; Sagua, H.; Gonzalez, J.; Araya, J. E. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. *J Biochem Mol Toxicol*. v. 25, n. 6, p. 393-403, 2011.
- Chalfant, C. E.; Spiegel, S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci*. v. 118, n. Pt 20, p. 4605-12, 2005.
- Chavira Jr, R.; Burnett, T. J.; Hageman, J. H. Assaying proteinases with azocoll. *Analytical Biochemistry*. v. 136, n. 2, p. 446-450, 1984.
- Chippaux, J. P. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des Devel Ther*. v. 6, p. 165-73, 2012.
- Chippaux, J. P.; Williams, V.; White, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. v. 29, p. 1279-1303, 1991.
- Chung, E. S.; Lee, G.; Lee, C.; Ye, M.; Chung, H. S.; Kim, H.; Bae, S. J.; Hwang, D. S.; Bae, H. Bee venom phospholipase A₂, a novel Foxp3+ regulatory T cell inducer, protects dopaminergic neurons by modulating neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease. *J Immunol*. v. 195, n. 10, p. 4853-60, 2015.
- Church, J. E.; Hodgson, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*. v. 40, n. 8, p. 1083-1093, 2002.
- Clark, R. F.; Girard, R. H.; Rao, D.; Ly, B. T.; Davis, D. P. Stingray envenomation: a retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases. *The Journal of Emergency Medicine*. v. 33, n. 1, p. 33-37, 2007.
- Cologna, C. T.; Marcussi, S.; Giglio, J. R.; Soares, A. M.; Arantes, E. C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein Pept Lett*. v. 16, n. 8, p. 920-32, 2009.
- Compagno, L. J. V. Checklist of living elasmobranches. In: HAMLETT, W. C. (Ed.). *Sharks, Skates, and Rays. The Biology of Elasmobranch Fishes*. Baltimore: John Hopkins University Press, 1999. p.471-498.
- Conceição, K.; Konno, K.; Melo, R. L.; Marques, E. E.; Hiruma-Lima, C. A.; Lima, C.; Richardson, M.; Pimenta, D. C.; Lopes-Ferreira, M. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon gr. orbigny*. *Peptides*. v. 27, n. 12, p. 3039-3046, 2006.

Conceição, K.; Santos, J. M.; Bruni, F. M.; Klitzke, C. F.; Marques, E. E.; Borges, M. H.; Melo, R. L.; Fernandez, J. H.; Lopes-Ferreira, M. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon gr. orbigny* freshwater stingray venom. *Peptides*. v. 30, n. 12, p. 2191-2199, 2009.

Costa, T. R.; Menaldo, D. L.; Prinholato Da Silva, C.; Sorrechia, R.; De Albuquerque, S.; Pietro, R. C.; Ghisla, S.; Antunes, L. M.; Sampaio, S. V. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. *Int J Biol Macromol*. v. 80, p. 489-97, 2015.

Cupo, P.; Jurca, M.; Azeedo-Marques, M. M.; Oliveira, J. S.; Hering, S. E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v. 36, n. 1, p. 67-76, 1994.

Damostrar, P.; Veeruraj, A.; Arumugam, M.; Balasubramanian, T. Biological and biochemical potential of sea snake venom and characterization of phospholipase A₂ and anticoagulation activity. *Indian J Clin Biochem*. v. 31, n. 1, p. 57-67, 2016.

Debin, J. A.; Maggio, J. E.; Strichartz, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol*. v. 264, n. 2 Pt 1, p. C361-9, 1993.

Dehghani, H.; Sajjadi, M. M.; Parto, P.; Rajaian, H.; Mokhlesi, A. Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. *Toxicon*. v. 55, n. 6, p. 1188-1194, 2010.

Dennis, E. A.; Cao, J.; Hsu, Y.-H.; Magrioti, V.; Kokotos, G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*. v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

Dhananjaya, B. L.; Nataraju, A.; Raghavendra Gowda, C. D.; Sharath, B. K.; D'souza, C. J. Vanillic acid as a novel specific inhibitor of snake venom 5'-nucleotidase: a pharmacological tool in evaluating the role of the enzyme in snake envenomation. *Biochemistry (Mosc)*. v. 74, n. 12, p. 1315-9, 2009.

Diego-Garcia, E.; Caliskan, F.; Tytgat, J. The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC Genomics*. v. 15, p. 295, 2014.

Diego-Garcia, E.; Schwartz, E. F.; D'suze, G.; Gonzalez, S. A.; Batista, C. V.; Garcia, B. I.; De La Vega, R. C.; Possani, L. D. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides*. v. 28, n. 1, p. 31-7, 2007.

Doery, H. M.; Pearson, J. E. Phospholipase B in snake venoms e bee venom. *Biochemical Journal*. v. 92, n. 3, p. 599-&, 1964.

Duran-Reynals, F. The invasion of the body by animal poisons. *Science*. v. 83, n. 2151, p. 286-7, 1936.

Estrada-Gómez, S.; Gomez-Rave, L.; Vargas-Muñoz, L.; Van Der Meijden, A. Characterizing the biological and biochemical profile of six different scorpion venoms from the Buthidae and Scorpionidae family. *Toxicon*. 2017.

Estrada-Gomez, S.; Munoz, L. J. V.; Saldarriaga-Cordoba, M.; Castillo, J. C. Q. Venom from *Opisthacanthus elatus* scorpion of Colombia, could be more hemolytic and less neurotoxic than thought. *Acta Tropica*. v. 153, p. 70-78, 2016.

Facó, P. E.; Bezerra, G. P.; Barbosa, P. S. F.; Martins, A. M. C.; Guimarães, J. A.; Ferreira, M. L.; Monteiro, H. S. A. Epidemiology of the injuries caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim) in Ceará State (1992-2002). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, n. 6, p. 479-482, 2005.

Farn, J. L.; Strugnell, R. A.; Hoyne, P. A.; Michalski, W. P.; Tennent, J. M. Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *Journal of Bacteriology*. v. 183, n. 22, p. 6717-6720, 2001.

Ferrante, N. D. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 220, p. 303-306, 1956.

Fleury, R. L'appareil venimeux des selaciens trygoniformes: (anatomie, histologie, physiologie). *Memories de la Société Zoologique de France*. v. 30, p. 1-37, 1950.

Fox, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon*. v. 62, p. 75-82, 2013.

Fox, J. W.; Serrano, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. v. 45, n. 8, p. 969-85, 2005.

Fry, B. G.; Roelants, K.; Champagne, D. E.; Scheib, H.; Tyndall, J. D.; King, G. F.; Nevalainen, T. J.; Norman, J. A.; Lewis, R. J.; Norton, R. S.; Renjifo, C.; De La Vega, R. C. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. v. 10, p. 483-511, 2009.

Fuller, M. D.; Thompson, C. H.; Zhang, Z. R.; Freeman, C. S.; Schay, E.; Szakacs, G.; Bakos, E.; Sarkadi, B.; McMaster, D.; French, R. J.; Pohl, J.; Kubanek, J.; Mccarty, N. A. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. *J Biol Chem*. v. 282, n. 52, p. 37545-55, 2007.

Fuzita, F. J.; Pinkse, M. W.; Patane, J. S.; Juliano, M. A.; Verhaert, P. D.; Lopes, A. R. Biochemical, transcriptomic and proteomic analyses of digestion in the scorpion *Tityus serrulatus*: insights into function and evolution of digestion in an ancient arthropod. *PLoS One*. v. 10, n. 4, p. e0123841, 2015.

Garcia-Gomez, B. I.; Coronas, F. I.; Restano-Cassulini, R.; Rodriguez, R. R.; Possani, L. D. Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. *Toxicon*. v. 58, n. 1, p. 18-27, 2011.

Garrone Neto, D.; Haddad Jr., V. Acidentes por raias. In: CARDOSO, J. L. C.;FRANÇA, F. O. S., *et al* (Ed.). *Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2nd ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p.205-305.

Girish, K.; Kemparaju, K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: role in the management of poisonous bite. *Life sciences*. v. 78, n. 13, p. 1433-1440, 2006.

Girish, K. S.; Shashidharamurthy, R.; Nagaraju, S.; Gowda, T. V.; Kemparaju, K. Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie*. v. 86, n. 3, p. 193-202, 2004.

Gomes, U. L.; Rosa, R. S.; Gadig, O. B. F. *Dasyatis marianae*: a new species of stingray (Chondrichthyes: Dasyatidae) from the Southwestern Atlantic. *Copeia*. v. 200, n. 2, p. 300-305, 2000.

Goni, F. M.; Montes, L. R.; Alonso, A. Phospholipases C and sphingomyelinases: Lipids as substrates and modulators of enzyme activity. *Prog Lipid Res*. v. 51, n. 3, p. 238-66, 2012.

Gopalakrishnakone, P.; Possani, L. D.; Schwartz, E. F.; Vega, P. C. R. *Scorpion Venoms*. Springer Netherlanlans, 2015. 575p

Granger, D. N.; Kubes, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. v. 55, n. 5, p. 662-75, 1994.

Gutiérrez, J. M.; Avila, C.; Rojas, E.; Cerdas, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988.

Gutierrez, J. M.; Ownby, C. L.; Odell, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol*. v. 40, n. 3, p. 367-79, 1984.

Gutiérrez, J. M.; Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

Haddad Jr, V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, n. 5, p. 591-597, 2003.

Haddad Jr, V.; Garrone Neto, D.; Paula Neto, J. B.; Marques, F. P. L.; Barbaro, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*. v. 43, n. 3, p. 287-94, 2004.

Haddad Jr., V.; Cardoso, J. L.; Garrone Neto, D. Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. v. 19, n. 1, p. 16, 2013.

Halstead, B. W.; Auerbach, P. S.; Campbell, D. A. *Colours atlas of dangerous marine animals*. London:Wolfe Medical Publications, 1990. 192p

Halstead, B. W.; Bunker, N. C. Stingray attacks and their treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 2, n. 1, p. 115-128, 1953.

Halstead, B. W.; Ocampo, R. R.; Modglin, F. R. A study on the comparative anatomy of the venom apparatus of certain North American stingrays. *Journal of Morphology*. v. 97, n. 1, p. 1-21, 1955.

Hart, M. L.; Köhler, D.; Eckle, T.; Kloor, D.; Stahl, G. L.; Eltzhig, H. K. Direct treatment of mouse or human blood with soluble 5'-nucleotidase inhibits platelet aggregation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. v. 28, n. 8, p. 1477-1483, 2008.

Heppel, L. A.; Hilmo, R. Purification and properties of 5-nucleotidase. *Journal of Biological Chemistry*. v. 188, n. 2, p. 665-676, 1951.

Ismail, M. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. *International journal of antimicrobial agents*. v. 21, n. 2, p. 170-174, 2003.

Jeon, Y. H.; Heo, Y. S.; Kim, C. M.; Hyun, Y. L.; Lee, T. G.; Ro, S.; Cho, J. M. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol Life Sci*. v. 62, n. 11, p. 1198-220, 2005.

Jimenez-Charris, E.; Montealegre-Sanchez, L.; Solano-Reclondo, L.; Mora-Obando, D.; Camacho, E.; Castro-Herrera, F.; Fierro-Perez, L.; Lomonte, B. Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of Proteomics*. v. 114, p. 287-299, 2015.

Jorge, R. J. B.; Monteiro, H. S. A.; Goncalves-Machado, L.; Guarnieri, M. C.; Ximenes, R. M.; Borges-Nojosa, D. M.; Luna, K. P. D.; Zingali, R. B.; Correa-Netto, C.; Gutierrez, J. M.; Sanz, L.; Calvete, J. J.; Pla, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the caatinga ecoregion of northeastern Brazil. *Journal of Proteomics*. v. 114, p. 93-114, 2015.

Jridi, I.; Catacchio, I.; Majdoub, H.; Shahbazeddah, D.; El Ayeb, M.; Frassanito, M. A.; Ribatti, D.; Vacca, A.; Borchani, L. Hemilipin, a novel *Hemiscorpius lepturus* venom heterodimeric phospholipase A₂, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Toxicon*. v. 105, p. 34-44, 2015.

Kazemi-Lomedasht, F.; Khalaj, V.; Bagheri, K. P.; Behdani, M.; Shahbazzadeh, D. The first report on transcriptome analysis of the venom gland of Iranian scorpion, *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon*. v. 125, p. 123-130, 2017.

Khoo, H. E.; Yuen, R.; Poh, C. H.; Tan, C. H. Biological activities of *Synanceja horrida* (Stonefish) venom. *Natural Toxins*. v. 1, p. 54-60, 1992.

Kini, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*. v. 42, n. 8, p. 827-40, 2003.

_____. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes - Structure, Function and Mechanism*. Singapore:John Wiley & Sons, 1997. 511p

Klaassen, C. D.; Watkins, J. B. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York:McGraw-Hill, 1999. p

Kohler, G. A.; Brenot, A.; Haas-Stapleton, E.; Agabian, N.; Deva, R.; Nigam, S. Phospholipase A₂ and phospholipase B activities in fungi. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. v. 1761, n. 11, p. 1391-1399, 2006.

Le Hir, M.; Kaissling, B. Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine. *Am J Physiol*. v. 264, n. 3 Pt 2, p. F377-87, 1993.

Lessa, R. P. T.; Vooren, C. M.; Kotas, J. E.; Gadig, O. B. F. Elasmobrânquios. In: AQUASIS, I. (Ed.). *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade das zonas costeira e marinha*, 2002.

Lomonte, B.; Gutierrez, J. M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revista de Biología Tropical*. v. 31, n. 1, p. 37-40, 1983.

Louati, H.; Krayem, N.; Fendri, A.; Aissa, I.; Sellami, M.; Bezzine, S.; Gargouri, Y. A thermoactive secreted phospholipase A₂ purified from the venom glands of *Scorpio maurus*: relation between the kinetic properties and the hemolytic activity. *Toxicon*. v. 72, p. 133-42, 2013.

Lourenço, W. R. Scorpion diversity and distribution: past and present patterns. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.;POSSANI, L. D., *et al* (Ed.). *Introduction to scorpion biology and ecology*: Springer Nether lands, 2015. p.3-23.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 193, p. 265-275, 1951.

Luna-Ramirez, K.; Quintero-Hernandez, V.; Juarez-Gonzalez, V. R.; Possani, L. D. Whole transcriptome of the venom gland from *Urodacus yaschenko* Scorpion. *PLoS One*. v. 10, n. 5, p. e0127883, 2015.

Madokoro, M.; Ueda, A.; Kiriake, A.; Shiomi, K. Properties and cDNA cloning of a hyaluronidase from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. *Toxicon*. v. 58, n. 4, p. 285-92, 2011.

Magalhães, G. S.; Caporrino, M. C.; Della-Casa, M. S.; Kimura, L. F.; Prezotto-Neto, J. P.; Fukuda, D. A.; Portes-Junior, J. A.; Neves-Ferreira, A. G.; Santoro, M. L.; Barbaro, K. C. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie*. v. 95, n. 9, p. 1773-83, 2013.

Magalhães, K. W.; Lima, C.; Piran-Soares, A. A.; Marques, E. E.; Hiruma-Lima, C. A.; Lopes-Ferreira, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian

Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbignyi*. *Toxicon*. v. 47, n. 5, p. 575-583, 2006.

Magalhães, M. R. *Estudos bioquímicos do veneno de raias Potamotrygon motoro (Chondrichthyes: Dasyatidae, Potamotrygoninae) - Purificação e caracterização de uma hialuronidase*. 2001. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 62 p.

Magalhães, M. R.; Silva Jr, N. J.; Ulhoa, C. J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon*. v. 51, n. 6, p. 1060-1067, 2008.

Maretic, Z. Fish venoms. In: TU, A. T. (Ed.). *Handbook of Natural Toxins: Marine Toxins and Venoms*. New York: Marcel Dekker, 1988. p.445-477.

Margres, M. J.; Aronow, K.; Loyacano, J.; Rokyta, D. R. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *Bmc Genomics*. v. 14, 2013.

Margres, M. J.; Mcgivern, J. J.; Wray, K. P.; Seavy, M.; Calvin, K.; Rokyta, D. R. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Journal of Proteomics*. v. 96, p. 145-58, 2014.

Marinetti, G. V. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. v. 98, n. 3, p. 554-65, 1965.

Mcdermott, M.; Wakelam, M. J.; Morris, A. J. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*. v. 82, n. 1, p. 225-53, 2004.

Melani, R. D.; Araujo, G. D. T.; Carvalho, P. C.; Goto, L.; Nogueira, F. C. S.; Junqueira, M.; Domont, G. B. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venom of the brazilian rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *EuPA Open Proteomics*. v. 8, p. 144-156, 2015.

Meyer, P. K. Stingray injuries. *Environmental Medicine*. v. 8, n. 1, p. 24-28, 1997.

Monteiro, H.; Da Silva, I.; Martins, A.; Fonteles, M. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 34, n. 10, p. 1347-1352, 2001.

Moreau, M. E.; Garbacki, N.; Molinaro, G.; Brown, N. J.; Marceau, F.; Ccedil; Ois; Adam, A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *Journal of Pharmacological Sciences*. v. 99, n. 1, p. 6-38, 2005.

Moss, G. P. Enzyme Nomenclature. 2015. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> >. Acesso em: 20/02/2016.

Mukherjee, A. K. A major phospholipase A₂ from *Daboia russelii russelii* venom shows potent anticoagulant action via thrombin inhibition and binding with plasma phospholipids. *Biochimie*. v. 99, p. 153-61, 2014.

Naughton, M.; Sanger, F. Purification and specificity of pancreatic elastase. *Biochemical Journal*. v. 78, n. 1, p. 156-163, 1961.

Nelson, J. S. *Fishes of the World*. 4th. New Jersey:Jonh Wiley & Sons, 2006. 624p

Nunes, J. S.; Almeida, Z. S.; Piorski, N. M. Raias capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão - Brasil. *Arquivos de Ciências do Mar*. v. 38, n. 49-54, 2005.

Ocampo, R. R.; Halstead, B. W.; Modglin, F. R. The microscopic anatomy of the caudal appendage of the spotted eagleray *Aetobatus narinari* (Euphrasen) with special reference to the venom apparatus. *The Anatomical Records*. v. 115, p. 87-93, 1953.

Ogawa, Y.; Murayama, N.; Yanoshita, R. Molecular cloning and characterization of ecto-5'-nucleotidase from the venoms of *Gloydus blomhoffi*. *Toxicon*. v. 54, n. 4, p. 408-12, 2009.

Oliveira-Costal, F. *Estudo bioquímico, imunológico e farmacológico do veneno do escorpião *Hadruroides lunatus* e da patofisiologia do seu envenenamento*. 2013. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 101 p.

Oliveira Jr., N. G. *Análises transcritômicas do ferrão de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro**. 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília. 137 p.

Oliveira, U. C.; Candido, D. M.; Dorce, V. A.; Junqueira-De-Azevedo I., L. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. *Toxicon*. v. 95, p. 52-61, 2015.

Ortiz, E.; Rendon-Anaya, M.; Rego, S. C.; Schwartz, E. F.; Possani, L. D. Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. *Biochim Biophys Acta*. v. 1840, n. 6, p. 1738-46, 2014.

Pedroso, C. M.; Jared, C.; Charvet-Almeida, P.; Almeida, M. P.; Garrone Neto, D.; Lira, M. S.; Haddad Jr, V.; Barbaro, K. C.; Antoniazzi, M. M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*. v. 50, n. 5, p. 688-97, 2007.

Poh, C. H.; Yuen, R.; Chung, M. C. M.; Khoo, H. E. Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. v. 101, p. 159-163, 1992.

Porta, A. Recherche anatomiche sull'apparecchio velenifero di alcuni pesci. *Anatomische Anzeiger*. *Anatomische Anzeiger*. v. 26, p. 232-247, 1905.

Pucca, M. B.; Cerni, F. A.; Pinheiro Junior, E. L.; Bordon Kde, C.; Amorim, F. G.; Cordeiro, F. A.; Longhim, H. T.; Cremonez, C. M.; Oliveira, G. H.; Arantes, E. C. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. *Toxicon*. v. 108, p. 272-84, 2015.

Pukrittayakamee, S.; Warrell, D. A.; Desakorn, V.; Mcmichael, A. J.; White, N. J.; Bunnag, D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon*. v. 26, n. 7, p. 629-37, 1988.

Quintero-Hernandez, V.; Jimenez-Vargas, J. M.; Gurrola, G. B.; Valdivia, H. H.; Possani, L. D. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. v. 76, p. 328-42, 2013.

Ramanaiah, M.; Parthasarathy, P. R.; Venkaiah, B. Purification and properties of phospholipase A₂ from the venom of scorpion, (*Heterometrus fulvipes*). *Biochem Int.* v. 20, n. 5, p. 931-40, 1990.

Ramirez-Bello, V.; Sevcik, C.; Peigneur, S.; Tytgat, J.; D'suze, G. Macrophage alteration induced by inflammatory toxins isolated from *Tityus discrepans* scorpion venom. The role of Na(+)/Ca(2+) exchangers. *Toxicon*. v. 82, p. 61-75, 2014.

Ren, Q.; Zhao, X. F.; Wang, J. X. Identification of three different types of serine proteases (one SP and two SPs) in Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* v. 30, n. 2, p. 456-66, 2011.

Richmond, G. S.; Smith, T. K. Phospholipases A₁. *International journal of molecular sciences*. v. 12, n. 1, p. 588-612, 2011.

Rodrigues, R. J. Pharmacology of South American freshwater stingray venom (*Potamotrygon motoro*). *Transactions of New York Academy of Science*. v. 34, n. 8, p. 677-686, 1972.

Rodriguez De La Vega, R. C.; Possani, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. v. 46, n. 8, p. 831-44, 2005.

Rokyta, D. R.; Ward, M. J. Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the black-back scorpion (*Hadrurus spadix*) reveal detectability challenges and an unexplored realm of animal toxin diversity. *Toxicon*. v. 128, p. 23-37, 2017.

Rusmili, M. R. A.; Yee, T. T.; Mustafa, M. R.; Hodgson, W. C.; Othman, I. Proteomic characterization and comparison of malaysian *Bungarus candidus* and *Bungarus fasciatus* venoms. *Journal of Proteomics*. v. 110, p. 129-144, 2014.

Russell, F. E. Stingray injuries: a review and discussion of their treatment. *The American Journal of the Medical Science*. v. 226, n. 6, p. 611-622, 1953.

Russell, F. E.; Van Harreveld, A. Cardiovascular effects of the venom of the round stingray, *Urobatis halleri*. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique*. v. 62, n. 3, p. 322-333, 1954.

Sajevic, T.; Leonardi, A.; Krizaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. v. 57, n. 5, p. 627-45, 2011.

Santibanez-Lopez, C. E.; Possani, L. D. Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. *Toxicon*. v. 107, n. Pt B, p. 317-26, 2015.

Schwartz, E. F.; Camargos, T. S.; Zamudio, F. Z.; Silva, L. P.; Bloch Jr, C.; Caixeta, F.; Schwartz, C. A.; Possani, L. D. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*. v. 51, n. 8, p. 1499-508, 2008.

Schwartz, E. F.; Diego-Garcia, E.; Rodriguez De La Vega, R. C.; Possani, L. D. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics*. v. 8, p. 119, 2007.

Schwartz, E. F.; Schwartz, C. A.; Gomez-Lagunas, F.; Zamudio, F. Z.; Possani, L. D. HgeTx1, the first K⁺-channel specific toxin characterized from the venom of the scorpion *Hadrurus gertschi* Soleglad. *Toxicon*. v. 48, n. 8, p. 1046-53, 2006.

Serrano, S. M. T.; Maroun, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

Silva, G. C.; Sabino, J.; Alho, C. J.; Nunes, V. L.; Haddad Jr, V. Injuries and envenoming by aquatic animals in fishermen of Coxim and Corumba municipalities, state of Mato Grosso do Sul, Brazil: identification of the causative agents, clinical aspects and first aid measures. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 43, n. 5, p. 486-490, 2010.

Silva Jr, N. J.; Aird, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. v. 128, n. 3, p. 425-456, 2001.

Sivan, G.; Venketasvaran, K.; Radhakrishnan, C. K. Characterization of biological activity of *Scatophagus argus* venom. *Toxicon*. v. 56, n. 6, p. 914-25, 2010.

Six, D. A.; Dennis, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

Smith, D. S.; Cayer, M. L.; Russell, F. E. Membrane-limited microtubular aggregates in the venom secreting cells of a stingray. *Toxicon*. v. 12, n. 3, p. 331-5, 1974.

Soldatova, L.; Kochoumian, L. Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. *FEBS letters*. v. 320, n. 2, p. 145-149, 1993.

Stern, R.; Jedrzejewski, M. J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*. v. 106, n. 3, p. 818-39, 2006.

Stockmann, R. Introduction to scorpion biology and ecology. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; POSSANI, L. D., *et al* (Ed.). *Scorpion Venoms*: Springer Netherlands, 2015. p.25-59.

Sukprasert, S.; Rungsa, P.; Uawonggul, N.; Incamnoi, P.; Thammasirirak, S.; Daduang, J.; Daduang, S. Purification and structural characterisation of

phospholipase A₁ (Vespapase, Ves a 1) from Thai banded tiger wasp (*Vespa affinis*) venom. *Toxicon*. v. 61, p. 151-64, 2013.

Sulkowsky, E.; Björk, W.; Laskowsky, M. R. S. A specific and no specific alkaline monophosphatase in venom of *Bothrops atrox* and their occurrence in the purified venom phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 238, p. 2477-2486, 1963.

Tan, N. H.; Ponnudurai, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp Biochem Physiol C*. v. 103, n. 2, p. 299-302, 1992.

Teixeira, C.; Cury, Y.; Moreira, V.; Picolo, G.; Chaves, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. v. 54, n. 1, p. 67-76, 2009.

Thompson, C. H.; Olivetti, P. R.; Fuller, M. D.; Freeman, C. S.; McMaster, D.; French, R. J.; Pohl, J.; Kubanek, J.; Mccarty, N. A. Isolation and characterization of a high affinity peptide inhibitor of ClC-2 chloride channels. *J Biol Chem*. v. 284, n. 38, p. 26051-62, 2009.

Torres-Larios, A.; Gurrola, G. B.; Zamudio, F. Z.; Possani, L. D. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem*. v. 267, n. 16, p. 5023-31, 2000.

Trummal, K.; Samel, M.; Aaspollu, A.; Tonismägi, K.; Titma, T.; Subbi, J.; Siigur, J.; Siigur, E. 5'-Nucleotidase from *Vipera lebetina* venom. *Toxicon*. v. 93, p. 155-163, 2015.

Uniprotkb. 2015. Disponível em: <
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=phospholipase+organism%3Ascorpion&sort=score>>. Acesso em: 25/02/2016.

Uribe, J. I. C.; Vargas, J. M. J.; Batista, C. V. F.; Zuñiga, F. Z.; Possani, L. D. Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. *Toxicon*. v. 125, p. 91-98, 2017.

Valdez-Cruz, N. A.; Segovia, L.; Corona, M.; Possani, L. D. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A₂ from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Gene*. v. 396, n. 1, p. 149-58, 2007.

Venancio, E. J.; Portaro, F. C.; Kuniyoshi, A. K.; Carvalho, D. C.; Piddé-Queiroz, G.; Tambourgi, D. V. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralization potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon*. v. 69, p. 180-90, 2013.

Viala, V. L.; Hildebrand, D.; Fucase, T. M.; Sciani, J. M.; Prezotto-Neto, J. P.; Riedner, M.; Sanches, L.; Nishimura, P. J.; Oguiura, N.; Pimenta, D. C.; Schluter, H.; Betzel, C.; Arni, R. K.; Spencer, P. J. Proteomic analysis of the rare uracoan

rattlesnake *Crotalus vegrandis* venom: Evidence of a broad arsenal of toxins. *Toxicon*. v. 107, p. 234-251, 2015.

Wahby, A.; Mahdy, E.-S. M.; El-Mezayen, H. A.; Salama, W. H.; Ebrahim, N. M.; Abdel-Aty, A. M.; Fahmy, A. S. Role of hyaluronidase inhibitors in the neutralization of toxicity of Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. v. 10, n. 2, p. 213-219, 2012a.

Wahby, A. F.; Mahdy El, S. M.; El-Mezayen, H. A.; Salama, W. H.; Abdel-Aty, A. M.; Fahmy, A. S. Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom hyaluronidase: purification, partial characterization and evidence for its action as a spreading factor. *Toxicon*. v. 60, n. 8, p. 1380-9, 2012b.

Waite, M. *Handbook of the Lipid Research - The Phospholipases*. New York:Plenum Press, 1987. 332p

Wallace, M. A.; Carter, H. R. Effects of the wasp venom peptide, mastoparan, on a phosphoinositide specific phospholipase C purified from rabbit brain membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*. v. 1006, n. 3, p. 311-316, 1989.

Warrell, D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. *Infectious Disease Clinics of North America*. v. 26, n. 2, p. 207-23, 2012.

Weissbach, H.; Robertson, A. V.; Witkop, B.; Udenfriend, S. Rapid spectrophotometric assays for snake venom L-amino acid oxidase based on the oxidation of L-kynurenine or 3,4-dehydro-L-proline. *Analytical Biochemistry*. v. 1, p. 286-90, 1960.

Wiesel, G. A.; Dos Santos, P. K.; Cordeiro, F. A.; Bordon, K. C. F.; Selistre-De-Araujo, H. S.; Ueberheide, B.; Arantes, E. C. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. *Toxicon*. v. 107, p. 359-368, 2015.

Xu, S. Y.; Zhao, L. S.; Larsson, A.; Venge, P. The identification of a phospholipase B precursor in human neutrophils. *Febs Journal*. v. 276, n. 1, p. 175-186, 2009.

Yang, Y. R.; Follo, M. Y.; Cocco, L.; Suh, P. G. The physiological roles of primary phospholipase C. *Adv Biol Regul*. v. 53, n. 3, p. 232-41, 2013.

Yang, Z. M.; Yang, Y. E.; Chen, Y.; Cao, J.; Zhang, C.; Liu, L. L.; Wang, Z. Z.; Wang, X. M.; Wang, Y. M.; Tsai, I. H. Transcriptome and proteome of the highly neurotoxic venom of *Gloydius intermedius*. *Toxicon*. v. 107, p. 175-186, 2015.

Zeng, X. C.; Corzo, G.; Hahin, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life*. v. 57, n. 1, p. 13-21, 2005.

Zhijian, C.; Feng, L.; Yingliang, W.; Xin, M.; Wenxin, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon*. v. 47, n. 3, p. 348-55, 2006.